



PATRICIA SOTOMAIOR

**ESTUDO DA REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA PROTEÍNA NifA DE *Azospirillum
brasiliense***

CURITIBA

2012

PATRICIA SOTOMAIOR

**ESTUDO DA REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DA PROTEÍNA NifA DE *Azospirillum
brasiliense***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel M. de Souza

Co-orientadoras: Profa. Dra. Leda S. Chubatsu
Dra. Luíza Maria de Araújo

CURITIBA

2012

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Sotomaior, Patricia

Estudo da regulação da atividade da proteína NifA de *Azospirillum
brasiliense*. / Patricia Sotomaior. – Curitiba, 2012.
73 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Emanuel Maltempi de Souza

Co-orientadora: Leda Satie Chubatsu

Co-orientadora: Luíza Maria de Araújo

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. *Azospirillum brasiliense* 2. Nitrogenio – fixação I. Título II. Souza,
Emanuel Maltempi de III. Chubatsu, Leda Satie IV. Araújo, Luíza Maria de
V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 589.95

TERMO DE APROVAÇÃO

PATRICIA SOTOMAIOR

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências-Bioquímica no Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão Examinadora formada pelos professores:



Prof. Dr Emanuel Maltempi de Souza - orientador
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Dr. Marco Aurélio Schüler de Oliveira
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR



Profa. Dra. Ana Cláudia Bonatto
Departamento de Genética - UFPR

Curitiba, 15 de fevereiro de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Emanuel M. de Souza, pela oportunidade de realizar este trabalho, orientação e sugestões.

Às minhas co-orientadoras, Profa. Dra. Leda S. Chubatsu e Dra. Luíza Maria de Araújo, pela orientação, apoio, dedicação e confiança.

Ao Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa pela oportunidade de trabalhar no grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio.

A todos os professores do Instituto de Fixação Biológica de Nitrogênio, em especial à Profa. Dra. Rose Adele Monteiro, pela oportunidade de trabalhar com a proteína NifA, e ao Prof. Dr. Luciano Huergo, pelas sugestões e colaboração.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial à Roseli Prado e ao Valter de Baura, pela colaboração e disponibilidade.

Ao Dr. Marco Aurélio Oliveira pela ajuda e conselhos sobre a proteína NifA.

Aos colegas dos laboratórios 271 e 272 e demais colegas do Grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio pela amizade, carinho, colaboração, dedicação, força, conselhos, incentivo e apoio durante todo o meu trabalho no laboratório.

Aos colegas da turma de Mestrado 2010 pela amizade e incentivo.

À minha família, em especial minha mãe e meu pai, pelo amor, confiança e incentivo incondicionais.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, representado pelos professores Dr. Miguel D. Nosedá e Dra. Silvia M. S. C. Cadena, pela disponibilidade e atenção.

Aos órgãos financiadores, CNPq, CAPES e INCT – Fixação Biológica de Nitrogênio pelo apoio financeiro.

RESUMO

A fixação biológica de nitrogênio é fundamental para disponibilizar este elemento em uma forma que seja metabolicamente utilizável pela maioria dos organismos. Este processo é catalizado pela enzima nitrogenase, que reduz o dinitrogênio gasoso a amônia. A transcrição dos genes envolvidos neste processo é ativada pela proteína NifA, que tem sua atividade controlada pelos níveis de nitrogênio fixado e oxigênio. A proteína NifA é uma proteína ativadora de transcrição da família das EBP, composta por três domínios estruturais. Em *A. brasilense*, o domínio N-terminal está envolvido na regulação por íons amônio, enquanto um provável grupo Fe-S localizado nos domínios central e C-terminal está envolvido com a sensibilidade ao oxigênio. Para testar a habilidade de uma proteína NifA N-truncada (sem o domínio N-terminal) em ativar a transcrição dos genes *nif*, nós usamos as estirpes de *E. coli* YMC10 (estirpe selvagem), RB9060 (*glnB*⁻), WCH30 (*glnK*⁻) e UNF3435 (*glnB*⁻ e *glnK*⁻), que possuem uma fusão *nifH-lacZ* cromossomal. A proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* foi capaz de ativar a fusão *nifH-lacZ* apenas na ausência de oxigênio, confirmando que os domínios central e C-terminal estão envolvidos na regulação por O₂. A atividade foi semelhante tanto na presença quanto na ausência de amônio. Houve uma diminuição da atividade da proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* quando esta é co-expressa com seu domínio N-terminal, revelando que esta porção tem a função de controlar negativamente a atividade da proteína NifA na presença de íons amônio. A expressão da proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* e de seu domínio N-terminal foram confirmadas através de imunodeteção. A proteína His-NifA N-truncada foi purificada em anaerobiose e apresentou baixa afinidade pela coluna contendo Ni⁺² em ambiente livre de oxigênio. A proteína His-NifA N-truncada purificada apresentou atividade, sendo capaz de se ligar ao promotor do gene *nifH* de *A. brasilense*.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio, *Azospirillum brasilense*, proteína NifA N-truncada.

ABSTRACT

The biological nitrogen fixation is essential to provide the element nitrogen in a form that is metabolically usable by most organisms. This process is catalyzed by the nitrogenase, which reduces dinitrogen to ammonia. The transcription of genes involved in this process is activated by the NifA protein which is controlled by fixed nitrogen and oxygen levels. The NifA protein is a transcriptional activator protein of the EBP family, consisting of three structural domains. In *A. brasilense*, the N-terminal domain is involved in regulation by ammonium ions, while a putative Fe-S cluster located at the central and C-terminal domain is involved in oxygen sensitivity. To test the ability of an N-truncated NifA protein (without the N-terminal domain) to activate the *nif* gene transcription, we used the *E. coli* strains YMC10 (wild type), RB9060 (*glnB*⁻), WCH30 (*glnK*) and UNF3435 (*glnB*⁻ and *glnK*) carrying a chromosomal *nifH-lacZ* fusion. The *A. brasilense* N-truncated NifA protein was able to activate the *nifH-lacZ* fusion only in the absence of oxygen, confirming that the central domain and C-terminal are involved in O₂ regulation. The activity was similar both in the presence or absence of ammonium. There was a decreasing activity when the *A. brasilense* N-truncated NifA protein was co-expressed with its N-terminal domain, revealing that this portion has the function of negatively controlling NifA activity in the presence of ammonium ions. Expression of the *A. brasilense* N-truncated NifA protein expression and N-terminal domain were confirmed by immunodetection. The His-N-truncated NifA protein was purified anaerobically and showed low affinity to a Ni⁺² bound column in an oxygen-free environment. The purified His-N-truncated NifA protein showed activity, being able to binding to the *A. brasilense nifH* promoter.

Keywords: Biological nitrogen fixation, *Azospirillum brasilense*, N-truncated NifA protein.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Modelo da regulação da atividade da proteína NifA de *A. brasilense* em resposta a amônio e na presença da proteína PII 24
- Figura 2** – Ativação transcricional do gene *nifH* *in vivo* pela proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* na estirpe de *E. coli* YMC10 (selvagem) 44
- Figura 3** – Ativação transcricional do gene *nifH* *in vivo* pela proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* na estirpe de *E. coli* RB9060 (*glnB*⁻) 45
- Figura 4** – Ativação transcricional do gene *nifH* *in vivo* pela proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* na estirpe de *E. coli* WCH30 (*glnK*⁻) 46
- Figura 5** – Ativação transcricional do gene *nifH* *in vivo* pela proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* na estirpe de *E. coli* UNF3435 (*glnB*⁻ e *glnK*⁻) 47
- Figura 6** – Imunodeteção da proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* expressa nas estirpes de *E. coli* YMC10, RB9060, WCH30 e UNF3435 transformadas com o plasmídeo pCNK5CCT 50
- Figura 7** – Imunodeteção da proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* expressa nas estirpes de *E. coli* YMC10, RB9060, WCH30 e UNF3435 transformadas com os plasmídios pCNK5CCT e pCNK7NT 51
- Figura 8** – Imunodeteção do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* expresso nas estirpes de *E. coli* YMC10, RB9060, WCH30 e UNF3435 transformadas com os plasmídios pCNK5CCT e pCNK7NT 52
- Figura 9** – Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) 10% das frações protéicas obtidas durante a cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Chelating ligada a Ni⁺² (GE Healthcare) em ambiente anaeróbico 55

Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X dos produtos de amplificação da região promotora do gene *nifH* de *A. brasilense* obtidos com diferentes temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos 57

Figura 11 – Ensaio de ligação da proteína His-NifA N-truncada à região promotora do gene *nifH* de *A. brasilense* 59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Estirpes de Bactérias	27
TABELA 2 – Plasmídios	28
TABELA 3 – Antibióticos	30
TABELA 4 – Tampões utilizados para purificação da proteína NifA N-truncada em coluna Hi-Trap Chelating Ni ²⁺	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
Amp	Ampicilina
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
Cm	Cloranfenicol
D.O.	Densidade ótica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	5'-trifosfato de 2'-desoxinucleotídeo
DTT	Ditiotreitol
e⁻	Elétron
EBP	<i>Enhancer binding protein</i>
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
IHF	<i>Integration Host Factor</i>
IPTG	β-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	Quilo dalton
kΩ	Quilo ohms
Km	Canamicina
L	Litro
m/v	Massa por volume
ONPG	o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietileno glicol
Pi	Fosfato inorgânico
RNA	Ácido ribonucléico
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
TEMED	N,N,N,N' – tetrametil, etilenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
UAS	<i>Upstream Activating Sequence</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Fixação Biológica de Nitrogênio	13
2.1.1 Complexo da nitrogenase	13
2.2 Gênero <i>Azospirillum</i>	14
2.3 Genes <i>nif</i>	15
2.4 Proteína NifA	16
2.4.1 Regulação da expressão do gene <i>nifA</i>	17
2.4.2 Controle da atividade da proteína NifA	17
2.4.3 Controle da atividade da proteína NifA por amônio	19
2.4.4 Controle da atividade da proteína NifA por oxigênio.....	21
2.5 Proteínas PII	22
2.5.1 Envolvimento da Proteína PII no controle da atividade de NifA.....	23
3. JUSTIFICATIVA.....	25
4. OBJETIVOS.....	26
4.1. Objetivo Geral.....	26
4.2. Objetivos Específicos.....	26
5. METODOLOGIA	27
5.1 Bactérias e Plasmídios	27
5.2 Meios de Cultura.....	28
5.2.1 Meios empregados para o cultivo de <i>E. coli</i>	28
5.2.2 Meios empregados para o cultivo de <i>A. brasilense</i>	29
5.2.3 Antibióticos	29
5.3 Transformação Bacteriana.....	30
5.3.1 Preparo de células competentes	30
5.3.2 Transformação por choque térmico	31
5.4 Purificação de DNA plasmidial.....	31
5.5 Ensaio de ativação transcricional pela proteína NifA N-truncada	32
5.6 Atividade de β -Galactosidase	33
5.7 Dosagem de proteínas.....	34

5.8	Imunodeteccção	34
5.9	Purificação da proteína His-NifA N-truncada	35
5.9.1	Expressão da proteína His-NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i>	35
5.9.2	Purificação em coluna HiTrap Chelating Ni ²⁺	36
5.10	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante	37
5.11	Extração do DNA total de <i>Azospirillum brasilense</i>	37
5.12	Amplificação da região promotora do gene <i>nifH</i> de <i>A. brasilense</i>	38
5.13	Ligação de DNA	39
5.14	Eletroforese de DNA	39
5.15	Ensaio de ligação <i>in vitro</i> da proteína NifA N-truncada ao DNA	40
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6.1	Ensaio de ativação transcricional <i>in vivo</i> pela proteína NifA N- truncada de <i>Azospirillum brasilense</i>	42
6.2	Efeito da co-expressão do domínio GAF N-terminal e da proteína NifA N-truncada em estirpes de <i>E. coli</i>	48
6.2	Expressão e Purificação da proteína His-NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i> em <i>E. coli</i> em ambiente livre de oxigênio	53
6.3	Ensaio <i>in vitro</i> de atividade de ligação da proteína His-NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i> à região promotora do gene <i>nifH</i> de <i>A. brasilense</i>	56
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
8.	CONCLUSÕES	62
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. INTRODUÇÃO

O estudo da fixação biológica de nitrogênio é de grande importância, pois o nitrogênio é um dos fatores limitantes para o desenvolvimento das plantas (DIXON e KAHN, 2004) e também o mais caro dos fertilizantes agrícolas. A utilização dos fertilizantes agrícolas encarece os custos da produção e seu uso acarreta diversos danos ecológicos. Uma alternativa biológica, barata e não poluente seria a utilização de microrganismos fixadores de nitrogênio ou diazotróficos que convertam o nitrogênio atmosférico a amônia e a disponibilizem para o vegetal (PEDROSA, 1987).

Entre os microrganismos diazotróficos capazes de se associar com plantas de interesse econômico está a espécie *Azospirillum brasilense*, um microrganismo associativo encontrado no solo ou associado a raízes de plantas como o milho, o trigo, o arroz e a cana-de-açúcar (DÖBEREINER e DAY, 1976). Estudos mostraram que *A. brasilense* pode influenciar positivamente o crescimento da planta, o suprimento de nitrogênio e o rendimento da plantação (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

A enzima responsável pela fixação biológica de nitrogênio é a nitrogenase. O processo catalizado por esta enzima é energeticamente custoso para a célula e por isso é altamente controlado, só ocorrendo em condições favoráveis. Este controle é feito através da regulação da expressão e atividade das proteínas envolvidas na fixação de nitrogênio (POSTGATE, 1982).

Em *Azospirillum brasilense*, a proteína NifA, ativadora da transcrição dos genes *nif*, é expressa tanto na presença como na ausência de íons amônio e oxigênio e sua atividade é regulada pelos níveis de NH_4^+ e O_2 , tornando-se ativa em condições de fixação de nitrogênio, ou seja, na ausência de amônio e sob baixa concentração de oxigênio (LIANG, KAMINSKI e ELMERICH, 1991; FADEL-PICHETH *et al.*, 1999). O controle por amônio envolve o domínio N-terminal de NifA (ARSÈNE, KAMINSKI e ELMERICH, 1996) e a proteína sinalizadora GlnB (ARAÚJO *et al.*, 2004). A proteína GlnB provavelmente interage com o domínio N-terminal de NifA, que possui atividade inibitória, permitindo que NifA ative a transcrição dos genes *nif*. Por outro lado, a inativação de NifA em altos níveis de oxigênio envolve um motivo com 4 cisteínas presentes no final do domínio central e na região entre os

domínios central e C-terminal. Este motivo aparentemente constitui um sítio de ligação de grupo Fe-S (FISCHER *et al.*, 1989; SOUZA *et al.*, 1999).

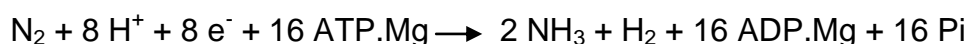
Apesar dos estudos sobre a regulação da fixação de N₂ em *A. brasilense*, alguns aspectos do mecanismo não estão completamente compreendidos. Este trabalho tem como objetivo estudar o mecanismo de regulação da atividade da proteína NifA *in vivo* e *in vitro* utilizando uma forma N-truncada da proteína NifA de *A. brasilense*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fixação Biológica de Nitrogênio

Um número relativamente pequeno de bactérias é capaz de transformar o nitrogênio atmosférico, não assimilável pelas plantas e animais, em amônia, que é utilizada pela maioria dos seres vivos na síntese de suas moléculas nitrogenadas (PEDROSA, 1987). O processo de redução do dinitrogênio gasoso (N₂) a amônia (NH₃) é chamado de fixação biológica de nitrogênio.

A enzima responsável pela fixação biológica de nitrogênio é a nitrogenase. Esta enzima catalisa a redução do dinitrogênio gasoso a amônia como mostra a reação abaixo (POSTGATE, 1982):



Como a transferência de elétrons nesta reação é dependente da hidrólise de ATP, a redução do nitrogênio envolve um alto custo energético para a célula (YATES, 1992; DEAN, BOLIN e ZHENG, 1993) e, portanto, este processo é altamente regulado, tanto ao nível de atividade da nitrogenase como de expressão dos seus genes (POSTGATE, 1982).

2.1.1 Complexo da nitrogenase

O complexo enzimático da nitrogenase é constituído de duas proteínas: a dinitrogenase redutase ou proteína ferro (Fe) e a dinitrogenase ou proteína ferro-molibdênio (FeMo) (DEAN e JACOBSEN, 1992). A proteína Fe é um homodímero constituído por duas subunidades γ de massa molecular total de 60kD e codificada pelo gene *nifH* (HOWARD e REES, 1996). Ela possui um núcleo FeS (Fe₄S₄) ancorado entre as duas subunidades e é responsável pela transferência de elétrons para a proteína FeMo (YATES, 1980). A proteína FeMo é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$ de

massa molecular total de cerca de 220kD. A subunidade α é codificada pelo gene *nifD* e a subunidade β é codificada pelo gene *nifK* (ROBERTS *et al.*, 1978; KIM e REES, 1994). A proteína FeMo contém 2 átomos de Mo, 30 átomos de Fe e 32 átomos de S organizados em 2 tipos de núcleos metálicos: núcleo P (FeS) e cofator ferro-molibdênio (FeMoco). Cada dímero $\alpha\beta$ contém um núcleo P e um cofator FeMoco (KIM e REES, 1994; SCHINDELIN *et al.*, 1997).

Além dos genes *nifHDK*, a biossíntese e o funcionamento do complexo da nitrogenase requer o produto de outros genes, necessários para o transporte de elétrons, regulação transcricional, biossíntese de cofatores e transporte de íons (DIXON e KAHN, 2004).

Este processo é energeticamente custoso para a célula e só ocorre em condições favoráveis. O nitrogênio fixado e o oxigênio afetam a expressão e atividade das proteínas envolvidas na fixação de nitrogênio nos diversos organismos diazotróficos (POSTGATE, 1982).

2.2 Gênero *Azospirillum*

As bactérias do gênero *Azospirillum* pertencem à classe das Alphaproteobacteria e são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico. Estas bactérias podem se associar a plantas de interesse econômico, como o trigo, o milho, o arroz e a cana-de-açúcar (DÖBEREINER, 1991). A maioria destas bactérias coloniza superficialmente as raízes das plantas, mas algumas espécies são capazes de se associar endofiticamente (PATRIQUIN, DÖBEREINER e JAIN, 1983).

Rizobactérias promotoras de crescimento do gênero *Azospirillum* são as mais estudadas e caracterizadas. A promoção do crescimento tem sido atribuída a diversos fatores, entre eles a fixação biológica de nitrogênio e a produção de hormônios promotores do crescimento para as plantas (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

As bactérias do gênero *Azospirillum* são potencialmente benéficas para a agricultura. Quando inoculadas no campo, estas bactérias foram capazes de aumentar o rendimento de várias gramíneas economicamente importantes,

influenciando positivamente o crescimento vegetal, o rendimento da safra e o conteúdo de nitrogênio da planta (STEENHOUDT e VANDERLEYDEN, 2000).

Atualmente são descritas doze espécies pertencentes a este gênero: *A. brasilense*, *A. lipoferum* (TARRAND, KRIEG e DÖBEREINER, 1978), *A. amazonense* (MAGALHÃES *et al.*, 1983), *A. halopraeferens* (REINHOLD *et al.*, 1987), *A. irakense* (KHAMAS *et al.*, 1989), *A. largomobile* (DEKHIL *et al.*, 1997), *A. doebereineriae* (ECKERT *et al.*, 2001), *A. oryzae* (XIE e YOKOTA, 2005), *A. melinis* (PENG *et al.*, 2006), *A. zae* (MEHNAZ, WESELOWSKI e LAZAROVITS, 2007a), *A. canadense* (MEHNAZ, WESELOWSKI e LAZAROVITS, 2007b), *A. rugosum* (YOUNG *et al.*, 2008). Entre as várias espécies, *A. brasilense* e *A. lipoferum* são as melhores caracterizadas.

2.3 Genes *nif*

Os genes *nif* codificam proteínas estruturais, regulatórias e acessórias necessárias para a montagem e biossíntese da nitrogenase e seus cofatores (MERRICK, 1993).

Em *K. pneumoniae*, os genes *nif* estão dispostos em 8 operons (*nifJ*, *nifHDKTY*, *nifENX*, *nifUSVW*, *nifZM*, *nifF*, *nifLA* e *nifBQ*), compreendendo 20 genes. As proteínas codificadas pelos genes *nifLA* são responsáveis pelo controle da transcrição dos demais genes *nif*, sendo a proteína NifA ativadora da transcrição e a NifL reguladora de NifA em *K. pneumoniae* (MERRICK, 1983; MERRICK *et al.*, 1982).

Em *Azospirillum brasilense*, o gene *nifA* faz parte de um operon monocistrônico (SINGH, TRIPATHI e ROBERTS, 1989), diferente do que ocorre em *K. pneumoniae* e *A. vinelandii*, onde o gene *nifA* faz parte do operon *nifLA*.

A transcrição dos genes *nif* depende de promotores contendo uma sequência conservada (CTGGYAYR-N₄-TTGCA) nas regiões -25/-24 e -13/-12 em relação ao início de transcrição (FISCHER, 1994). Estes promotores são reconhecidos por uma forma da holoenzima RNA polimerase contendo o fator σ^{54} ou σ^N (MERRICK, 1993).

Em Proteobacteria, a regulação da transcrição dos genes *nif* é mediada inteiramente pela regulação da expressão e controle da atividade da proteína NifA. Não existem evidências que mostrem que a transcrição seja regulada de forma negativa por algum repressor de transcrição. Em todos os diazotrofos estudados, a fixação biológica de nitrogênio é regulada, principalmente, a nível transcricional e este controle é mediado em resposta aos níveis de oxigênio e nitrogênio fixado (MERRICK, 1993).

2.4 Proteína NifA

A proteína NifA, uma proteína ativadora de transcrição da família das EBP (*enhancer binding protein*), atua em conjunto com a enzima σ^N -RNA polimerase para catalisar a formação do complexo aberto para início da transcrição (AUSTIN, HENDERSON e DIXON, 1990). Sem a presença da proteína ativadora, a σ^N -RNA polimerase associada ao promotor é incapaz de catalizar a passagem de complexo fechado para complexo aberto. A proteína ativadora atua como um efetor positivo da transcrição de promotores σ^N e sua atividade é controlada por sinais fisiológicos. A interação da RNA polimerase com a proteína ativadora requer a formação de dobra no DNA. O dobramento do DNA pode ser facilitado ou induzido pela ligação da proteína IHF (*Integration Host Factor*) (MERRICK, 1993).

As EBP são uma classe única de reguladores transcricionais procarióticos que ativam a expressão do gene através de sítios distantes do promotor. A proteína NifA liga-se a uma sequência conservada, denominada UAS (*Upstream Activator Sequence*) (5'-TGT-N₁₀-ACA-3'), localizada a montante do promotor -24/-12. Essa sequência está presente na maioria dos promotores dependentes de NifA e localiza-se a uma distância de 80 a 150 nucleotídeos a montante do sítio de início da transcrição (MORETT e BUCK, 1988). A formação do complexo aberto e início de transcrição requer a hidrólise de ATP catalisada pela proteína NifA (AUSTIN, HENDERSON e DIXON, 1990).

A sequência UAS juntamente com a sequência reconhecida pela σ^N -RNA polimerase formam uma região promotora. Aparentemente, a função da UAS seria orientar corretamente a NifA para facilitar a interação com o complexo σ^N -RNA

polimerase e aumentar a concentração da proteína NifA na vizinhança do complexo fechado (BUCK *et al.*, 1987).

2.4.1 Regulação da expressão do gene *nifA*

Em *K. pneumoniae*, o gene *nifA* forma um operon com o gene *nifL*, cujo produto, a proteína NifL, tem função inibitória de NifA (MERRICK *et al.*, 1982). A expressão do operon *nifLA* ocorre em baixos níveis de amônia e necessita do fator σ^N e da proteína ativadora NtrC fosforilada, cuja atividade é controlada pelo sistema *ntr* (MERRICK e CHAMBERS, 1992). Em relação ao oxigênio, a expressão é controlada pelo estado superhelicoidal do promotor *nifLA* (WHITEHALL, AUSTIN e DIXON, 1992).

Em *A. brasilense*, a análise da região promotora do gene *nifA* sugere que a sua transcrição, embora estimulada na ausência de amônia, é independente de NtrC (LIANG, KAMINSKI e ELMERICH, 1991; LIANG, ARSÈNE e ELMERICH, 1993; FADEL-PICHETH *et al.*, 1999). A caracterização da região promotora indicou um promotor do tipo σ^{70} como provável promotor do gene *nifA* e a repressão máxima desse gene depende do efeito combinado entre amônio e oxigênio (FADEL-PICHETH *et al.*, 1999).

2.4.2 Controle da atividade da proteína NifA

As proteínas NifA dos diversos microrganismos possuem estruturas modulares similares, mas a regulação de sua atividade, em relação aos níveis de oxigênio e amônio, varia significativamente entre os organismos (REYES-RAMIREZ, LITTLE e DIXON, 2001).

Em *K. pneumoniae* e *A. vinelandii*, a atividade da proteína NifA é inibida pela proteína NifL em resposta a altas concentrações de oxigênio ou íons amônio (DIXON *et al.*, 1997). Estas duas proteínas são expressas estequiometricamente e, na presença de altas concentrações de amônia e/ou oxigênio, formam um complexo

protéico inativo. Sob condições de fixação de nitrogênio, NifL se dissocia, liberando NifA ativa (MARTINEZ-ARGUDO *et al.*, 2004). Apesar de a proteína NifA apresentar similaridade com a proteína NtrC, ela não é uma proteína clássica da família de reguladores de resposta de sistema de dois componentes. O domínio N-terminal não possui o resíduo de aspartato conservado, que é o sítio de fosforilação em proteínas reguladoras de resposta como NtrC e não existe nenhuma evidência de que NifA seja fosforilada em qualquer condição (MERRICK, 2004). Assim, as proteínas NifL e NifA fazem parte de um sistema atípico de dois componentes, sendo que a comunicação entre as proteínas não envolve fosforilação e sim comunicação proteína-proteína (DIXON *et al.*, 1997). É possível que a proteína NifL possa interferir em vários passos do mecanismo de ação da proteína NifA. Em *A. vinelandii*, a proteína NifL inibe a capacidade de ligação ao DNA, a atividade ATPásica e a capacidade de ativadora de transcrição da proteína NifA nativa *in vitro* (AUSTIN *et al.*, 1994).

A proteína NifL é uma flavoproteína redox-sensitiva, capaz de modular a atividade da proteína NifA de acordo com o estado de oxidação do FAD (HILL *et al.*, 1996). Ela também exerce uma atividade inibitória sobre a proteína NifA na presença de altos níveis de nitrogênio fixado. Evidências sugerem que componentes do sistema geral de sensoriamento de nitrogênio (sistema *ntr*) possam estar envolvidos (CONTRERAS *et al.*, 1991). A inativação de um gene homólogo a *glnD* em *A. vinelandii* resulta em um fenótipo *nif*⁻. Esse fenótipo é revertido por uma mutação no gene *nifL*, sugerindo que o produto de *glnD* possa ser necessário para manter NifL inativa em condições de baixos níveis de amônio (CONTRERAS *et al.*, 1991).

Em *H. seropedicae* e *A. brasilense*, não há proteína NifL. A proteína NifA tem sua atividade controlada negativamente pelos níveis de oxigênio e pela concentração de amônio (SOUZA *et al.*, 1999; ARSÈNE, KAMINSKI e ELMERICH, 1996). Em *A. brasilense*, a proteína NifA é expressa tanto na presença quanto na ausência de nitrogênio fixado. Neste organismo, a proteína NifA parece estar presente em uma forma ativa ou inativa dependendo dos níveis de oxigênio e nitrogênio fixado. A proteína NifA de *A. brasilense* só foi capaz de ativar a expressão de uma fusão *nifH-lacZ* em *E. coli* quando a proteína GlnB de *A. brasilense* estava presente na ausência de amônio (ARAÚJO *et al.*, 2004). Já a proteína NifA sem o domínio N-terminal é ativa independente da presença da proteína PII e de nitrogênio fixado (ARSÈNE, KAMINSKI e ELMERICH, 1996). Vários dados levam a formulação

de uma hipótese de que, em *A. brasilense*, a região N-terminal da NifA inibe a atividade da proteína em condições de excesso de nitrogênio e que em condições de fixação de nitrogênio, GlnB-UMP se ligaria à NifA, removendo o efeito inibitório do domínio N-terminal (ARSÈNE, KAMINSKI e ELMERICH, 1999).

Portanto, em organismos como *A. vinelandii* e *K. pneumoniae*, a proteína NifL sofre alterações na presença de oxigênio e amônio, podendo assim atuar sobre a proteína NifA, inibindo-a (DIXON *et al.*, 1997). Já em organismos como *A. brasilense* e *H. seropedicae*, a própria proteína NifA é que sofre as alterações em resposta à variação dos níveis de oxigênio e amônio (SOUZA *et al.*, 1999; ARSÈNE, KAMINSKI e ELMERICH, 1996), não havendo participação da proteína NifL.

2.4.3 Controle da atividade da proteína NifA por amônio

A maioria das proteínas NifA conhecidas possuem três domínios estruturais típicos. O domínio N-terminal varia de 64 a 216 aminoácidos, possui um baixo grau de identidade e é o domínio mais variável entre as proteínas NifA (FISCHER, 1994). Este domínio está relacionado com o controle da atividade de NifA, mas não é essencial para a sua atividade, uma vez que proteínas N-truncadas são capazes de ativar a expressão de *nifH*. Em *H. seropedicae*, este domínio parece estar envolvido no controle da atividade da proteína NifA por íons amônio, uma vez que, ao ser deletado, não interfere na ativação de transcrição da proteína, eliminando, porém, a inibição por amônio (SOUZA *et al.*, 1999). Em *Azospirillum brasilense*, esse domínio também possui função inibitória sobre a atividade de NifA na presença de amônia. Por outro lado, a proteína NifA de *A. brasilense* sem o domínio N-terminal é menos ativa que a selvagem em condições de fixação de nitrogênio, sugerindo que esse domínio possa ser necessário para uma atividade ótima, provavelmente por manter os outros domínios em uma conformação mais favorável ou por aumentar a estabilidade da proteína (ARSÈNE, KAMINSKI e ELMERICH, 1996). A região N-terminal contém um domínio GAF, que é encontrado em várias proteínas sensoras e sinalizadoras (ARAVIND e PONTING, 1997; HO, BURDEN e HURLEY, 2000), sendo provavelmente capaz de ligar pequenas moléculas. Foi mostrado por Little e Dixon (2003) que a ligação do efector α -cetoglutarato à proteína NifA de *A. vinelandii* é uma

propriedade do seu domínio GAF isolado. Esses mesmos autores sugerem que a ligação do α -cetoglutarato no domínio GAF da proteína NifA possa levar a mudanças conformacionais na proteína, tornando-a capaz de resistir a inibição por NifL.

Quando expresso *in trans*, o domínio N-terminal é capaz de inibir a atividade de NifA N-truncada de *H. seropedicae* (sem o domínio N-terminal) na presença de amônio (MONTEIRO *et al.*, 1999a). No entanto, em experimento de regulação *in trans* do domínio N-terminal sobre a forma N-truncada de NifA de *A. brasilense* não se mostrou efeito sobre a atividade transcricional (NISHIKAWA, 2010).

A regulação por NH_4^+ parece envolver uma proteína sinalizadora, provavelmente GlnB, já que mutantes *glnB* mostraram fenótipo Nif⁻, mesmo quando NifA foi expressa constitutivamente (ARSÈNE, KAMINSKI e ELMERICH, 1996).

Araújo e colaboradores (2004) avaliaram o papel das proteínas tipo PII na atividade da proteína NifA de *A. brasilense*, em *E. coli*. Neste organismo, a atividade de NifA foi determinada pela capacidade de ativação do promotor *nifH* de *Klebsiella pneumoniae* como uma fusão *nifH-lacZ*. Os autores demonstraram que a proteína PII, GlnB, é essencial para a atividade da NifA na ausência de amônio e de oxigênio em *E. coli*, e que GlnB não pode ser substituída pelas suas parálogas GlnZ ou GlnK, apesar da alta similaridades entre elas. Este estudo sugere dessa forma uma provável interação direta entre GlnB e NifA.

Chen e colaboradores (2005) confirmaram que o domínio GAF da proteína NifA de *Azospirillum brasilense* é capaz de ligar a GlnB, o que favorece o mecanismo que envolve uma interação direta proteína-proteína entre GlnB e o domínio GAF. A interação detectada sugere que GlnB não-uridililada é também capaz de se ligar ao domínio N-terminal. No entanto, apenas a ligação de GlnB sozinha não é suficiente para ativar a proteína NifA.

Através de ensaio de co-precipitação *in vitro* (*pull-down*), Zhou, Zou e Li (2008) confirmaram que GlnB interage com o domínio N-terminal de NifA de *A. brasilense* e sugeriram que os resíduos 66-88 e 165-176 do domínio N-terminal possuem função crítica na interação com GlnB.

2.4.4 Controle da atividade da proteína NifA por oxigênio

Os domínios N-terminal e central da proteína NifA são separados por uma região interdomínio chamada de “Q-linker” em *A. brasilense* (WOOTTON e DRUMMOND, 1989).

O domínio central da proteína NifA consiste de cerca de 240 aminoácidos. Este domínio contém um sítio de ligação para o ATP e para a interação com o fator σ^N (MORETT e SEGOVIA, 1993; GONZALEZ *et al.*, 1998), sendo responsável pela formação do complexo aberto (LEE, BERGER e KUSTU, 1993).

Os domínios central e C-terminal da proteína NifA de *A. vinelandii* estão ligados diretamente. Já em *A. brasilense*, estes domínios estão conectados por uma sequência interdomínio (WOOTTON e DRUMMOND, 1989). Este interdomínio possui duas cisteínas que, juntamente com mais duas cisteínas do domínio central, constituem um provável sítio de ligação de metais. Foi proposto que um grupo Fe-S possa se ligar a este sítio, sendo, portanto, sensível a variações no potencial redox intracelular, e estaria envolvido na sensibilidade da proteína NifA à inativação por oxigênio (FISCHER *et al.*, 1989; SOUZA *et al.*, 1999).

Estudos com proteínas NifA quiméricas de *H. seropedicae* e *Azotobacter vinelandii* revelaram que a sensibilidade ao O₂ não é dependente do domínio GAF. Neste mesmo trabalho, foi observado que o motivo conservado de cisteínas é essencial para a atividade de NifA, apesar de proteínas mutantes contendo substituições do resíduo de cisteína por serina ainda serem competentes em ligar DNA (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Nishikawa (2010) demonstrou que uma proteína NifA N-truncada de *A. brasilense*, mesmo purificada em atmosfera com oxigênio, retém a capacidade de se ligar ao promotor *nifB* de *H. seropedicae*, consistente com os resultados de Oliveira *et al.* (2009). Estes resultados também revelaram que a proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* parece ser menos sensível ao oxigênio se comparada a proteína NifA N-truncada de *H. seropedicae* (MONTEIRO *et al.*, 1999b).

O domínio C-terminal da proteína NifA, com cerca de 50 resíduos, contém um motivo conservado hélice-volta-hélice, envolvido na ligação ao DNA (WOOTTON e DRUMMOND, 1989).

2.5 Proteínas PII

As proteínas da família PII são estruturalmente muito conservadas e estão envolvidas na regulação do metabolismo de nitrogênio e têm sido encontradas em uma ampla variedade de bactérias (ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK, 2001). Elas recebem esse nome desde que foram identificadas, em 1969, devido ao seu pico de eluição em coluna de gel filtração ter sido o segundo, daí a denominação PII (SHAPIRO, 1969).

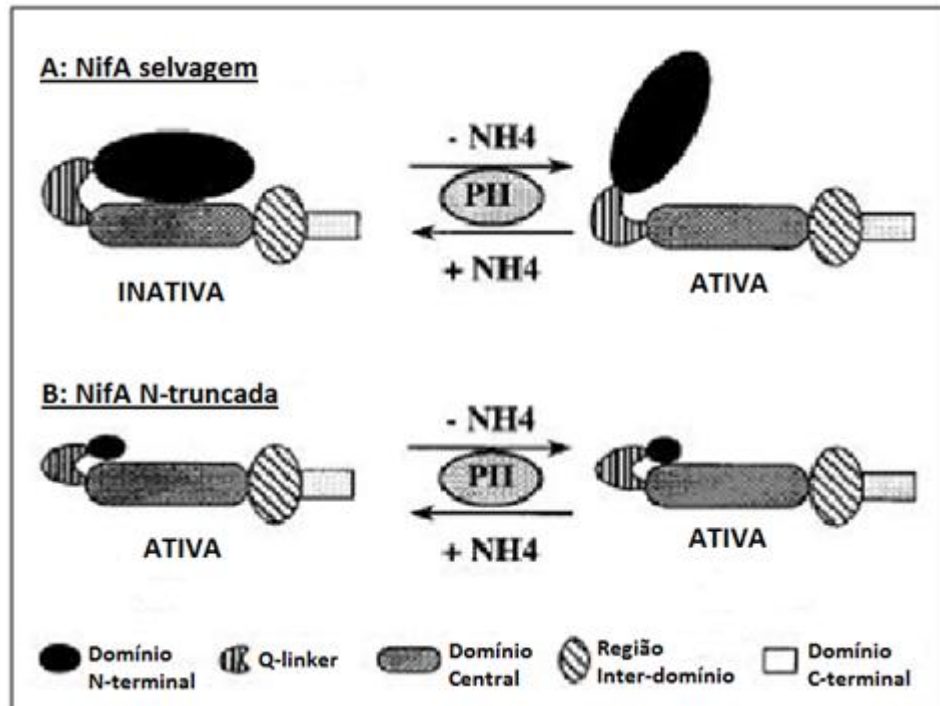
O gene estrutural da proteína PII, *glnB*, foi clonado e sequenciado inicialmente em *E. coli* (SON e RHEE, 1987) e *K. pneumoniae* (HOLTEL e MERRICK, 1988) e previsto codificar um polipeptídeo de 12,4 kDa, que na forma nativa se apresenta como um homotrímero. Este gene é bem conservado entre os organismos, sendo encontrado em proteobactérias, actinobactérias, firmibactérias, cianobactérias, arqueobactérias e também em plantas superiores, com alto grau de similaridade (ARCONDÉGUY, JACK e MERRICK, 2001).

Outra proteína na cascata de regulação do metabolismo de nitrogênio em *E. coli* é codificada pelo gene *glnK*, parálogo de *glnB* (van HEESWIJK *et al.*, 1996). GlnK parece funcionar apenas em condições limitantes de nitrogênio e, em *K. pneumoniae* e *A. vinelandii* regula a atividade da proteína NifL (JACK, de ZAMAROCZY e MERRICK, 1999; HE *et al.*, 1998).

O gene *glnB* de *A. brasilense* foi identificado por Holtel e Merrick (1988) e codifica para a proteína GlnB. Esta proteína é sintetizada em altos níveis sob condições limitantes de nitrogênio e em baixos níveis sob condições de excesso de nitrogênio (de ZAMAROCZY; DELORME; ELMERICH, 1990; de ZAMAROCZY; PAQUELIN; ELMERICH, 1993; HUERGO *et al.*, 2003). Em 1996, de Zamaroczy e colaboradores identificaram um gene que codifica para outra proteína PII em *A. brasilense* e denominaram-na GlnZ. Apesar da alta similaridade desta com a proteína GlnB, GlnZ possui função diferente e está envolvida no transporte de íons amônio (de ZAMAROCZY, 1998).

2.5.1 Envolvimento da Proteína PII no controle da atividade de NifA

A indicação de que alguma proteína PII estaria envolvida com a regulação da atividade da proteína NifA veio com a observação de que, em *A. brasilense*, mutantes *glnB* são Nif⁻ (LIANG *et al.*, 1992), enquanto mutantes *glnZ* são Nif⁺ (de ZAMAROCZY, 1998). Em 1996, Arsène, Kaminski e Elmerich construíram uma proteína NifA N-truncada e observaram que esta estava sempre ativa, independentemente da presença ou ausência de GlnB e de amônio, e sugeriram que o domínio N-terminal seria o responsável pela inibição (Figura 1) e que a proteína PII seria requerida para ativar NifA, retirando o efeito inibitório do domínio N-terminal. Ainda, em 1999, os mesmos autores mostraram que uma única mutação em um resíduo de tirosina 18 do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* resultou em uma proteína ativa que não requer PII em condições de fixação de nitrogênio. Situação similar ocorre em *H. seropedicae*. Estudos *in vivo* da proteína NifA de *H. seropedicae* mostram que ela é inativa quando expressa em *E. coli* (SOUZA *et al.*, 1999) mas a sua forma N-truncada permanece ativa (MONTEIRO *et al.*, 1999b), indicando que a inativação da proteína NifA de *H. seropedicae* em *E. coli* poderia ser devido à ausência de uma proteína semelhante a PII, que então poderia interagir com o domínio N-terminal, retirando a inibição e tornando NifA ativa.



Fonte: Adaptado de ARSÈNE, KAMINSKI e ELMERICH (1996).

Figura 1 - Modelo da regulação da atividade da proteína NifA de *A. brasilense* em resposta a amônio e na presença da proteína PII. (A) Proteína NifA selvagem sofre inibição pelo domínio N-terminal na presença de amônio. (B) Proteína NifA N-truncada não sofre inibição devido à ausência do domínio N-terminal, estando sempre ativa na presença da PII e na ausência ou presença de amônio.

3. JUSTIFICATIVA

Os estudos de Monteiro e colaboradores (1999a) mostraram que a expressão *in trans* do domínio N-terminal de NifA é capaz de inibir a atividade da proteína NifA N-truncada de *H. seropedicae* (sem o domínio N-terminal) na presença de amônio. No entanto, experimentos de regulação *in trans* do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* e da sua forma NifA N-truncada, realizados por Nishikawa (2010), mostraram que não houve efeito sobre a atividade transcricional. Neste trabalho de Nishikawa (2010), o ensaio de ativação transcricional foi realizado utilizando uma fusão *nifH-lacZ* presente em um plasmídio transformado na estirpe de *E. coli* JM109 (DE3). Para verificar a regulação *in trans* do domínio N-terminal sobre a porção N-truncada, foram ainda transformados nesta estirpe de *E. coli* um plasmídio contendo o gene que codifica para a proteína NifA N-truncada e outro contendo o gene que codifica para o domínio N-terminal. Nesta situação, na qual três plasmídios são transformados na mesma célula bacteriana, a possibilidade de um dos plasmídios serem expulsos ou a expressão estar comprometida é grande, sendo que não foi confirmada a expressão da proteína NifA N-truncada, nem de seu domínio N-terminal. Visando compreender melhor o mecanismo de regulação da atividade da proteína NifA de *Azospirillum brasilense* e verificar a existência da regulação *in trans* do domínio N-terminal sobre a porção N-truncada não confirmada neste organismo, faz-se necessário realizar novo ensaio de ativação transcricional *in vivo* para esclarecer o mecanismo de regulação envolvendo o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense*.

Neste mesmo trabalho de Nishikawa (2010) foi observado que a proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* aparentemente é menos sensível ao oxigênio comparada à proteína NifA N-truncada de *H. seropedicae*, que apresenta atividade próxima a zero nesta condição (MONTEIRO *et al.*, 1999b). Assim, a proteína NifA de *A. brasilense* pode ser mais facilmente purificada e caracterizada *in vitro*, objetivos a serem cumpridos neste trabalho para melhor compreender o mecanismo de controle da atividade frente aos níveis de nitrogênio e oxigênio desta proteína.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Estudar os mecanismos de regulação da atividade da proteína NifA de *Azospirillum brasilense*.

4.2. Objetivos Específicos

Determinar a atividade *in vivo* da proteína NifA N-truncada de *Azospirillum brasilense* em *E. coli*.

Purificar a proteína NifA N-truncada de *Azospirillum brasilense* em ambiente livre de oxigênio.

Determinar a atividade *in vitro* da proteína NifA N-truncada de *Azospirillum brasilense* purificada em ambiente livre de oxigênio através de atividade de ligação da proteína ao DNA.

5. METODOLOGIA

5.1 Bactérias e Plasmídios

As estirpes de bactérias e os plasmídios utilizados neste trabalho estão listados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

TABELA 1 – Estirpes de Bactérias

<i>Escherichia coli</i>	Características	Referência
BL21 (λDE3) pLysS	<i>hsdS</i> , <i>gal</i> (λ clts 857 <i>ind1</i> <i>Sam7</i> <i>nin5</i> <i>lacUV5-T7 gene 1</i>) (produtora da RNA polimerase do fago T7, New England Biolabs)	SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989
DH10B	F' [<i>proAB</i> , <i>lacZ</i> ΔM15], NaI ^R	SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989
YMC10 <i>nifH-lacZ</i>	Δ <i>lacU169 endA1 thi-1 hsdR17 supE44 hutC_K</i> (Km ^R)	ARCONDÉGUY, van HEESWIJK e MERRICK (1999)
RB9060 <i>nifH-lacZ</i>	Δ <i>lacU169 endA1 thi-1 hsdR17 supE44 hutC_K ΔglnB2306</i> (Km ^R)	ARCONDÉGUY, van HEESWIJK e MERRICK (1999)
WCH30 <i>nifH-lacZ</i>	Δ <i>lacU169 endA1 thi-1 hsdR17 supE44 hutC_K Ω Gm^R ΔglnK1</i> (Km ^R , Gm ^R)	ARCONDÉGUY, van HEESWIJK e MERRICK (1999)
UNF3435 <i>nifH:lacZ</i>	Δ <i>lacU169 endA1 thi-1 hsdR17 supE44 hutC_K ΔglnB2306 Ω Gm^R ΔglnK1</i> (Km ^R , Gm ^R)	ARCONDÉGUY, van HEESWIJK e MERRICK (1999)
<i>Azospirillum brasilense</i>	Característica	Referência
FP2	Sp7 (ATCC 29145) Nif ⁺ , NaI ^R , Sm ^R .	PEDROSA e YATES (1984)

TABELA 2 – Plasmídios

Plasmídios	Características	Referência
pCNpETCCT	Expressa a proteína His-NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i> a partir do promotor T7 (vetor pET28a). Km ^R	NISHIKAWA, 2010
pCNK5CCT	Expressa a proteína His-NifA N-truncada de <i>A. brasilense</i> a partir do promotor <i>tac</i> (vetor pDK5). Amp ^R	NISHIKAWA, 2010
pCNK7NT	Expressa o domínio N-terminal da proteína NifA de <i>A. brasilense</i> fusionado a cauda His na porção N-terminal a partir do promotor <i>tac</i> (vetor pDK7). Cm ^R	NISHIKAWA, 2010
pPSpnifHpTZ57R	Contém a sequência da região promotora do gene <i>nifH</i> de <i>A. brasilense</i> clonada no vetor pTZ57R/T. Amp ^R .	Este trabalho
pTZ57R/T	Vetor de clonagem. Amp ^R .	Fermentas

5.2 Meios de Cultura

5.2.1 Meios empregados para o cultivo de *E. coli*

Os meios de cultura utilizados no cultivo das estirpes de *E. coli* foram Luria-Broth (LB), LA e Nitrogen-Free Davis e Mignoli (NFDM), com as seguintes composições:

Luria-Broth ou LB (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989): 5 g/L de extrato de levedura; 10 g/L de NaCl; 10 g/L de triptona; pH 7.0.

LA (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989): meio LB + 15 g/L de ágar.

Para o cultivo das estirpes de *E. coli* YMC10, RB9060, WCH30 e UNF3435, foi adicionado 0,2% de glutamina aos meio LB e LA no momento do uso.

NFDM (CANNON, DIXON e POSTGATE, 1974): 0,1 g/L de MgSO₄; 0,025 g/L de Na₂MoO₄.2H₂O; 0,025 g/L de FeSO₄.7H₂O.

No momento do uso, para preparo do pré-inóculo, o meio NFDM foi modificado pela adição de 100 µg/mL de glutamina, 5 µg/mL de tiamina, 0,1 g/L de NaCl, 5 mg/mL de CaCl₂, 5% de meio LB, 20 g/L de glucose, 12,06 g/L de K₂HPO₄ e

3,4 g/L de KH_2PO_4 . Para o preparo do inóculo, o meio NFDM foi modificado pela adição de 100 $\mu\text{g/mL}$ de glutamina, 5 $\mu\text{g/mL}$ de tiamina, 0,1 g/L de NaCl, 5 mg/mL de CaCl_2 , 20 g/L de glucose, 12,06 g/L de K_2HPO_4 e 3,4 g/L de KH_2PO_4 , 0,5 mM/L de IPTG e 100 $\mu\text{g/mL}$ de serina, na presença ou ausência de 20 mmol/L de NH_4Cl .

5.2.2 Meios empregados para o cultivo de *A. brasilense*

O meio NFbHP foi utilizado para o cultivo de *A. brasilense* (PEDROSA e YATES, 1984; MACHADO *et al.*, 1991) e possui a seguinte composição: 4,0 g/L KH_2PO_4 ; 6,0 g/L K_2HPO_4 ; 0,2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g/L NaCl; 0,2 g/L CaCl_2 ; 0,2 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,002 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $2,35 \cdot 10^{-3}$ g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $2,8 \cdot 10^{-3}$ g/L H_3BO_3 ; $8,0 \cdot 10^{-5}$ g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $2,4 \cdot 10^{-4}$ g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $5,6 \cdot 10^{-2}$ g/L ácido nitrilo triacético; 5,0 g/L lactato de sódio e $1,0 \cdot 10^{-4}$ g/L biotina.

Como fonte de nitrogênio foi utilizado 20 mmol/L de NH_4Cl e o meio passou a se chamar NFbHPN. A mistura de fosfato e a solução de cloreto de amônio foram autoclavadas separadamente e adicionados ao meio no momento do uso.

5.2.3 Antibióticos

Os antibióticos utilizados estão descritos na Tabela 3 e foram adicionados ao meio de cultura de acordo com a resistência da estirpe de *E. coli* ou do vetor.

TABELA 3 – Antibióticos

Antibióticos	Solução Estoque (mg/mL)	Concentração final (µg/mL)
Ampicilina (Amp)	250	250
Ácido Nalidíxico (Nal)	10	10
Canamicina (Km)	100	100
Cloranfenicol (Cm)	30	30
Estreptomicina (Sm)	80	80

5.3 Transformação Bacteriana

5.3.1 Preparo de células competentes

O método para transformação bacteriana foi realizado segundo Chung, Niemela e Miller (1989). Aliquotas de 5 mL de cultura de *E. coli* foram cultivadas em meio LB na presença de antibióticos a 37°C sob agitação constante (180 rpm) por, aproximadamente, 16 horas. Cinquenta mililitros deste pré-inóculo foram transferidos para um frasco contendo 5 mL de meio LB (proporção 1:100). Esta cultura foi incubada a 37°C até atingir uma D.O.₆₀₀ entre 0,2 e 0,5. A cultura foi mantida em gelo por 10 minutos, aliquotada em tubos (1 mL) e centrifugada a 13400 rpm a 4°C por 1 minuto. O precipitado de células foi ressuscitado em 100 µL de solução estéril de TSS (10% PEG8000, 30 mmol/L MgCl₂, 5% DMSO e meio LB para completar, pH 6.5) e as células estavam prontas para uso. Esta preparação sempre era utilizada no mesmo dia para a transformação.

5.3.2 Transformação por choque térmico

Cinco microlitros de plasmídeo íntegro ou 10 µL de reação de ligação foram misturados aos 100 µL de células competentes e incubados por 30 minutos em banho de gelo. A mistura foi submetida a um choque térmico incubando-a por 30 segundos a 42°C e posteriormente em banho de gelo por 2 minutos. Após o choque térmico, foi adicionado 1 mL de meio LB e a suspensão de células foi transferida para um frasco estéril e incubada a 37°C por 1 hora para recuperação. Alíquotas de 300 µL da suspensão foram plaqueadas em meio LA contendo antibiótico adequado.

5.4 Purificação de DNA plasmidial

O isolamento dos plasmídios e vetores contidos nas bactérias *E. coli* foi realizado pelo método de lise alcalina (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989, modificado). Alíquotas de 1,5 mL de cultura de *E. coli* cultivadas em meio LB a 37°C sob agitação constante (180 rpm) por, aproximadamente, 16 horas foram coletadas por centrifugação a 13400 rpm por 1 minuto. O precipitado de células foi ressuspenso em 150 µL de tampão GET (50 mmol/L glucose, 10 mmol/L EDTA pH 8.0, 25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0) e lisado com a adição de 150 µL de solução de lise (0,2 mol/L NaOH e 1% SDS). O lisado foi neutralizado pela adição de 150 µL de solução Kacf (3 mmol/L de acetato de potássio, 1,8 mol/L de ácido fórmico), a mistura foi homogeneizada e incubada em banho de gelo por 10 minutos. Após centrifugação de 5 minutos a 13400 rpm, ao sobrenadante foi adicionado 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 13400 rpm. À fase aquosa, coletada em novo tubo, foi adicionado 2 volumes de etanol 100%, seguido de incubação por 15 minutos à temperatura ambiente para que ocorresse a precipitação do DNA plasmidial. Após 10 minutos de centrifugação a 13400 rpm, o DNA precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado por 5 minutos a 13400 rpm. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi seco à temperatura ambiente e dissolvido em água ultrapura estéril.

5.5 Ensaio de ativação transcricional pela proteína NifA N-truncada

As estirpes de *E. coli* YMC10, RB9060, WCH30 e UNF3435 foram transformadas com o plasmídio pCNK5CCT que expressa a proteína NifA N-truncada. A indução desta proteína foi feita utilizando IPTG (β -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo). Os pré-inóculos foram cultivados em meio LB com adição de 100 μ g/mL de glutamina e antibióticos adequados a 37°C sob agitação constante (170 rpm) por, aproximadamente, 16 horas. Para preparo dos pré-inóculos em NDFM, foi adicionado 4 μ L do pré-inóculo saturado em 4 mL de meio mínimo NDFM suplementado com 100 μ g/mL de glutamina, 5 μ g/mL de tiamina, 0,1 g/L de NaCl, 5 mg/mL de CaCl₂, 5% de meio LB, 20 g/L de glucose, 12,06 g/L de K₂HPO₄, 3,4 g/L de KH₂PO₄ e antibióticos adequados. Os pré-inóculos em NDFM foram cultivados a 37°C sob agitação constante (170 rpm) por, aproximadamente, 16 horas. Os inóculos utilizados para determinação da atividade de β -galactosidase foram preparados com a adição do pré-inóculo saturado em 4 mL de meio mínimo NDFM suplementado com 100 μ g/mL de glutamina, 5 μ g/mL de tiamina, 0,1 g/L de NaCl, 5 mg/mL de CaCl₂, 20 g/L de glucose, 12,06 g/L de K₂HPO₄ e 3,4 g/L de KH₂PO₄, 0,5 mmol/L de IPTG, 100 μ g/mL de serina e antibióticos adequados. Todos os inóculos partiram de uma D.O.₆₀₀ inicial de 0,1. Os inóculos foram cultivados a 30°C sob agitação constante (170rpm) por 16 horas.

Foram testadas quatro condições fisiológicas: presença ou ausência de amônio e presença ou ausência de oxigênio com o objetivo de verificar o efeito de NH₄⁺ e O₂ na regulação da atividade da proteína NifA N-truncada. A atividade foi avaliada pela ativação do promotor do gene *nifH* de *K. pneumoniae* da fusão *nifH-lacZ* cromossomal presente nas estirpes de *E. coli* utilizadas. A condição presença de amônio foi obtida pela adição de 20 mmol/L de NH₄Cl e a condição de ausência de oxigênio foi obtida através de troca de O₂ por N₂ na fase gasosa. Para isto, a fase gasosa de frascos de 25 mL, selados com rolhas de borracha, foi trocado por N₂ puro (White Martins, N₂ 5.0) por, no mínimo, 30 minutos.

Além de verificar a influência dos fatores amônio e oxigênio, também foi realizado ensaio de regulação *in trans* da proteína NifA N-truncada por seu domínio N-terminal. Estes ensaios foram realizados conforme descrito acima para a proteína NifA N-truncada, mas, nesse caso, as estirpes de *E. coli* que já possuem o plasmídio

pCNK5CCT, que expressa a proteína NifA N-truncada, foram transformadas adicionalmente com o plasmídio pCNK7NT, que expressa o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense*.

5.6 Atividade de β -Galactosidase

Os ensaios de ativação transcricional pela proteína NifA N-truncada foram determinados através da atividade de β -galactosidase (MILLER, 1992). O ensaio foi realizado com triplicata biológica e duplicata de atividade.

A 100 μ L das culturas foram acrescentados 900 μ L de tampão Z (60 mmol/L Na_2HPO_4 , 40 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mmol/L KCl, 1 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mmol/L β -mercaptoetanol e 0,0027% SDS) e 25 μ L de clorofórmio. Após agitação em vórtex, a mistura foi incubada a 30°C por 10 minutos e a reação foi iniciada pela adição de 200 μ L de uma solução de ONPG 4 mg/mL. A reação foi interrompida com a adição de 500 μ L de Na_3CO_3 1 mol/L no momento em que se observou coloração amarela devida à formação de *o*-nitrofenol. Após a reação ser interrompida, a mistura foi centrifugada a 13400 rpm por 5 minutos para que os restos celulares se depositassem no fundo do tubo. A leitura das absorbâncias foi feita a 420 nm, correspondente à absorbância do *o*-nitrofenol. A densidade ótica da cultura foi determinada em 600 nm. A atividade de β -galactosidase é dada como unidades Miller, calculada pela seguinte equação:

$$\text{Atividade} = \frac{1000 \times \text{D.O.}_{420}}{T \times V \times \text{D.O.}_{600}}$$

Onde: T = tempo (minutos)

V = volume da cultura (mL)

D.O.₆₀₀ = densidade ótica em 600 nm

5.7 Dosagem de proteínas

As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de Bradford (1976). O sistema foi realizado em microplaca de 96 poços e continha 250 μ L de solução de Bradford comercial (Sigma) e 5 μ L de amostra. A leitura da absorbância foi realizada em 595 nm. A curva padrão foi elaborada utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A sensibilidade deste método é de 0,1 a 1,4 mg/mL de proteína (segundo informação do fabricante Sigma)

5.8 Imunodeteção

A determinação da presença das proteínas NifA N-truncada e domínio N-terminal nos ensaios de ativação transcricional foi realizada por *immunoblotting* como descrito por Burnette (1981).

As amostras foram dosadas pelo método de Bradford e 0,1 μ g de extrato total foi aplicado em um gel de poliacrilamida desnaturante, realizado como descrito por Laemmli (1970). Após a corrida, o gel foi colocado em um aparato para transferência (Novablot 2117-250 LBK Pharmacia) juntamente com uma membrana de PVDF (Hybond P - GE Healthcare) utilizando um sistema de transferência semi-seco. A transferência foi feita por 1 hora a 80 mA.

Após a transferência, a membrana foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação constante em tampão TBST (50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 150 mmol/L NaCl, 0,002% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado para que houvesse o bloqueio de sítios inespecíficos na membrana. Então, foi adicionado o anticorpo anti-NifA N-truncada ou anti-domínio N-terminal de *H. seropedicae* obtidos comercialmente em uma diluição de 1:20.000 e o sistema foi incubado por mais duas horas à temperatura ambiente e sob agitação constante. A membrana foi lavada 3 vezes com tampão TBST por 15 minutos e foi adicionado anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (GE Healthcare) diluído 1:10.000 em TBST com 5% de leite desnatado e incubado durante 2 horas à temperatura ambiente sob agitação. A membrana foi lavada novamente 3 vezes com tampão TBST por 15

minutos. Após as lavagens, a revelação da membrana foi realizada por quimioluminescência, utilizando o kit ECL Plus (GE Healthcare) segundo procedimento recomendado pelo fabricante e a imagem foi registrada em um sistema de vídeo-imagem acoplados (UVP).

5.9 Purificação da proteína His-NifA N-truncada

5.9.1 Expressão da proteína His-NifA N-truncada de *A. brasilense*

O plasmídio pCNpETCCT (NISHIKAWA, 2010), que expressa a proteína His-NifA N-truncada de *A. brasilense* a partir do promotor T7, foi transformado na estirpe de *E. coli* BL21 (DE3). Duas a três colônias resultantes da transformação foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo antibiótico canamicina e incubada a 37°C durante a noite. Esta cultura foi inoculada em 300 mL de meio LB na proporção de 1:100 e incubada sob agitação constante (120 rpm) a 37°C até atingir uma D.O.₆₀₀ entre 0,5 e 0,7. Neste momento, foi adicionado 0,5 mmol/L de IPTG e a cultura foi incubada a 18°C por 16 horas sob agitação constante (120 rpm). Após a indução, as células foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi levado para dentro da câmara anaeróbica *Glove Box*. As células foram ressuspensas em 10 mL de um tampão contendo 0,5 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8,0, 10% glicerol e 1 mmol/L DDT. A suspensão foi colocada dentro de uma seringa lacrada e levada para fora da *Glove Box*, quando então as células foram lisadas em um prensa francesa previamente aerada com nitrogênio gasoso por 2 vezes. O lisado foi recolhido novamente à seringa e levado para dentro da *Glove Box*, sendo colocado dentro de um tubo para centrifugação. O extrato lisado foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C para separação da fração solúvel e insolúvel. O sedimento foi ressuspenso em água ultra-pura para análise da fração insolúvel. A fração solúvel foi levada novamente para a *Glove Box*, onde foi utilizada para purificação da proteína His-NifA N-truncada.

5.9.2 Purificação em coluna HiTrap Chelating Ni²⁺

A proteína NifA N-truncada foi expressa em *E. coli* a partir do promotor T7 como uma proteína de fusão contendo uma sequência de seis resíduos de histidinas. Foi utilizada uma coluna cromatográfica de afinidade contendo Ni²⁺ (coluna HiTrap-Chelating Ni²⁺ 1 mL - GE Helthcare) acoplada a uma bomba peristáltica, seguindo instruções do fornecedor. A eluição da proteína foi realizada utilizando tampão contendo concentrações crescentes de imidazol, segundo Nishikawa (2010), conforme a Tabela 4 abaixo:

TABELA 4 – Tampões utilizados para purificação da proteína NifA N-truncada em coluna Hi-Trap Chelating Ni²⁺ (segundo Nishikawa, 2010)

Tampão	Tris-HCl pH 8.0 (mmol/L)	NaCl (mmol/L)	Glicerol (%)	DTT (mmol/L)	Imidazol (mmol/L)
1	50	500	5	0,1	50
2	50	500	5	0,1	100
3	50	500	5	0,1	200
4	50	500	5	0,1	250
5	50	500	5	0,1	300
6	50	500	5	0,1	400
7	50	500	5	0,1	1000

Após a lise, realizada em uma *French Press*, a fração solúvel contendo a proteína His-NifA N-truncada foi aplicada na coluna. A coluna então foi lavada com 2 volumes do tampão 1 e a eluição da proteína se iniciou com 2 volumes de tampão 2 e 1 volume de cada um dos demais tampões. Foram coletadas frações de 1 mL e analisadas por eletroforese SDS-PAGE. A purificação foi realizada em ambiente livre de oxigênio em uma *Glove Box* (Omni-Lab System, VAC) aparelho desenvolvido para a manipulação de materiais sensíveis ao ar ou a água, ou que tenham a necessidade de uma atmosfera em particular; no caso, a atmosfera utilizada foi de

N₂. Este equipamento possui uma abertura para entrada e saída de objetos e substâncias e um par de luvas perfeitamente seladas e arranjadas de maneira que o operador possa acomodar suas mãos e executar tarefas no interior do equipamento.

5.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

A eletroforese de proteínas foi realizada em gel de poliacrilamida desnaturante como descrito por Laemmli (1970). A concentração do gel de empilhamento foi de 4,5% e a do gel de separação de 10%. A solução estoque de poliacrilamida foi de 30%, com relação de acrilamida:bis-acrilamida de 29,2:0,8. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical de acordo com a orientação do fabricante (BioRad). As amostras de proteínas foram misturadas com tampão de amostra (2% SDS, 10% glicerol, 0,01% azul de bromofenol, 0,0625 mol/L de Tris-HCl pH 6,8, 5% β-mercaptoetanol) e aquecidas a 100°C por 10 minutos. A corrida foi realizada a 150 V em tampão tris-glicina-SDS (25 mmol/L Tris-base, 192 mmol/L glicina, 0,1% SDS, pH 8.3). As proteínas foram coradas com corante Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,25% Coomassie Blue R-250, 45% metanol, 10% ácido acético glacial) e, em seguida, descoradas com solução descorante (45% metanol e 10% ácido acético glacial).

5.11 Extração do DNA total de *Azospirillum brasilense*

Cinco mililitros de uma cultura saturada de *A. brasilense* em NFbHP foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sedimento de células foi lavado uma vez com 5 mL de GET (50 mmol/L glucose, 25 mmol/L Tris.HCl pH 8.0, 10 mmol/L EDTA) e, em seguida, ressuspenso em 500 µL da mesma solução. Foi adicionada lisozima (100 µg/mL), incubada por 5-10 minutos e acrescentado 50 µL de SDS 10%. Esta suspensão foi incubada a 55°C por 40 minutos. Após a lise celular, foi adicionado Proteinase K (50 µg/mL) e a mistura incubada a 37°C durante a noite.

Para a purificação do DNA, foi feita uma extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e outra com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O DNA genômico foi precipitado com um volume de isopropanol e depois lavado com etanol 70%. Depois de seco a vácuo, o DNA foi dissolvido em 30 µL de água.

5.12 Amplificação da região promotora do gene *nifH* de *A. brasilense*

A amplificação da região promotora do gene *nifH* de *A. brasilense* foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) como descrito por Kocher e Wilson (1991). Foram utilizados oligonucleotídeos sintetizados quimicamente (Integrated DNA Technologies – IDT) com as seguintes sequências:

pnifH-Reverse:

5' – TAG **AAT TCA** ATC TGG CGC A – 3'
EcoRI

pnifH-Forward:

5' – CGC **TGC AGG** ACC GAC ATT C – 3'
PstI

Foram introduzidos sítios de restrição em cada oligonucleotídeo para facilitar a subclonagem em vetores de interesse.

Para a reação de amplificação foram utilizados: tampão 1X de PCR (20 mmol/L Tris.HCl pH 8.4 e 50 mmol/L KCl), 0,8 mmol/L dNTPs, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 0,8 mmol/L MgCl₂, 1 µL de DMSO, aproximadamente 20 ng de DNA molde (DNA genômico de *A. brasilense*) e 2U de *Taq* DNA polimerase (Fermentas) em um volume final de 20 µL.

Os parâmetros utilizados para os ciclos de amplificação foram 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto na temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos (10 temperaturas testadas: 45°C; 46,6°C; 47,7°C; 49°C; 50,4°C; 51,8°C; 53°C; 54,1°C; 55°C e 55,4°C), 45 segundos a 72°C e 15 minutos a 72°C.

O produto desta reação foi clonado pelo método TA em vetor pTZ57R/T (Fermentas) conforme as recomendações do fabricante. Este vetor permite a

amplificação da região clonada a partir dos oligonucleotídeos Universal e Reverso, marcados com fluoróforo, conforme mostrados abaixo:

UNI: 5' – FAM – GTT GTA AAA CGA CGG CCA GT – 3'

REV: 5' – VIC – TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG AC – 3'

Os oligonucleotídeos marcados foram adquiridos da Applied Biosystems.

A reação de amplificação para obter o promotor *nifH* marcado com os fluoróforos FAM e VIC continha tampão 1X de PCR (75 mmol/L Tris-HCl pH8.8, 20 mmol/L (NH₄)₂SO₄ e 0,1% Tween 20), aproximadamente 50 ng de DNA plasmidial (pPSnifHpTZ57R), 0,8 mmol/L de dNTP, 1,5 mmol/L MgCl₂, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 5% DMSO, 2U *Taq* DNA Polimerase (Fermentas) em um volume final de 50 µL.

O programa utilizado foi de 1 ciclo de 5 minutos a 95°C (desnaturação), 32 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 55°C (anelamento dos oligonucleotídeos) e 45 segundos a 72°C (extensão).

5.13 Ligação de DNA

O DNA correspondente à região promotora do gene *nifH* de *A. brasilense* obtido na reação de PCR foi misturado ao vetor pTZ57R/T linearizado (Fermentas) na proporção molar de 5:1 em tampão de ligação (40 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L DTT, 0,5 mmol/L ATP), aquecido a aproximadamente 65°C por 5 minutos e resfriado em banho de gelo. Em seguida, foi adicionado ao sistema 1U de T4 DNA ligase (Fermentas) e a mistura foi incubada a 16°C por 16 horas.

5.14 Eletroforese de DNA

As eletroforeses de DNA foram realizadas em gel de agarose horizontal conforme descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Os géis de agarose foram preparados em tampão TAE (40 mmol/L Tris-acetato e 1 mmol/L EDTA pH

8.3). A concentração de agarose variou de 1,0 a 1,5%, dependendo do tamanho de DNA analisado. As amostras foram misturadas com tampão FFSUDS (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA pH 8.0, 0,025% azul de bromofenol, 0,025% xileno cianol, 0,1% SDS, 20% Ficoll) e a corrida foi realizada no mesmo tampão em que o gel foi preparado, a 60V. O DNA foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta (312 nm) após tratamento com solução de brometo de etídio (1 µg/mL). O perfil eletroforético foi registrado utilizando um sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP).

5.15 Ensaio de ligação *in vitro* da proteína NifA N-truncada ao DNA

A atividade de ligação ao DNA da proteína NifA N-truncada foi analisada como descrito por Monteiro e colaboradores (1999b; 2001) através da técnica de retardamento de banda em gel (RICKWOOD e HAMES, 1990). A reação continha 0,1 µmol/L de DNA marcado com fluoróforo VIC e FAM (região promotora do gene *nifH* de *A. brasilense*), tampão de ligação (10 mmol/L Tris-acetato pH 8.0, 8 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L acetato de potássio, 1 mmol/L DTT e 3,5% (m/v) PEG 8000) e concentrações crescentes da proteína NifA N-truncada em um volume final de 20 µL. A região promotora do gene *nifH* de *A. brasilense* foi obtida por reação de PCR (item 5.12). A reação foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente (25°C). A formação do complexo DNA-proteína foi analisada através de eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 4% em tampão Tris-glicina (25 mmol/L Tris-base, 192 mmol/L glicina e 8 mmol/L MgCl₂, pH 8.3). A corrida foi realizada a 60V por 2-3 horas, utilizando tampão Tris-Glicina com 8 mmol/L MgCl₂ em atmosfera de nitrogênio. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta em aparelho de vídeo-imagem acoplados (UVP).

Para obter a constante de dissociação aparente (K_d aparente) da ligação da proteína NifA N-truncada purificada em anaerobiose, foi realizada uma análise densitométrica no mesmo aparelho de vídeo-imagem acoplados (UVP) utilizado para a captura da imagem do gel. As bandas analisadas foram as correspondentes ao DNA livre, considerando-se que quando não houvesse proteína, a banda correspondente ao DNA livre equivaleria a 0% de complexo DNA-proteína e que, na

concentração de 3,2 μM de proteína, a banda correspondente ao DNA livre equivaleria a 100% de complexo DNA-proteína. Estes dados foram plotados em um gráfico e o valor da concentração de proteína encontrado quando 50% do complexo DNA-proteína era formado correspondeu ao K_d aparente.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Ensaio de ativação transcricional *in vivo* pela proteína NifA N- truncada de *Azospirillum brasilense*

As proteínas NifA são ativadoras de transcrição da família das EBP (*enhancer binding protein*) e atuam como efetores positivos da transcrição de promotores σ^{54} , sendo que sua atividade é controlada por sinais fisiológicos (AUSTIN, HENDERSON e DIXON, 1990). Pelo fato da proteína NifA possuir esta característica, foi possível testar a capacidade da proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* de ativar *in vivo* a transcrição do gene *nifH* de *K. pneumoniae*. Para os ensaios de ativação transcricional, foram utilizadas estirpes de *E. coli* que apresentam uma fusão *nifH-lacZ* cromossomal. Estas estirpes não apresentam atividade endógena de β -galactosidase e, neste caso, se a proteína NifA N-truncada fosse expressa a partir de um plasmídio e apresentasse atividade nas condições testadas, ocorreria ativação do promotor *nifH* e, portanto, expressão da proteína β -galactosidase, que seria então detectada por sua atividade.

As estirpes de *E. coli* escolhidas para a realização deste ensaio foram as estirpes YMC10 (selvagem), RB9060 (*glnB*⁻), WCH30 (*glnK*⁻) e UNF3435 (*glnB*⁻ e *glnK*⁻) por apresentarem a fusão *nifH-lacZ* e, assim, não ser necessário transformar um plasmídio adicional contendo esta fusão.

Os ensaios foram realizados em quatro condições diferentes (presença ou ausência de NH_4^+ e presença ou ausência de O_2) com o objetivo de verificar a influência desses sinais fisiológicos na atividade de transcrição da proteína NifA N-truncada e uma possível regulação *in trans* da proteína por seu domínio N-terminal.

No primeiro ensaio realizado, um plasmídio contendo o gene que codifica a proteína NifA N-truncada foi transformado nas estirpes de *E. coli* com o objetivo de determinar a atividade da proteína sem sua porção N-terminal. Como observado na figura 2-C, a estirpe de *E. coli* YMC10 (selvagem), que foi transformada com o plasmídio que expressa a proteína NifA N-truncada, apresentou uma atividade de 710 e 791 unidades Miller na ausência de oxigênio, na presença e ausência de amônia, respectivamente. Esta atividade é cerca de 7 vezes maior se comparada

com a atividade na presença de oxigênio, mostrando que a proteína NifA N-truncada é inibida por altas concentrações de oxigênio e que sua atividade é independente da concentração de amônio no meio. A estirpe YMC10 sem nenhum plasmídio transformado (figura 2-A), não apresenta atividade de β -galactosidase, confirmando que a atividade observada anteriormente foi resultado da presença da proteína NifA N-truncada. O plasmídio que expressa a proteína NifA N-truncada também foi transformado nas estirpes RB9060 (*glnB*⁻), WCH30 (*glnK*⁻) e UNF3435 (*glnB*⁻ e *glnK*⁻). Como também observado na estirpe selvagem, a atividade em anaerobiose foi de 5 a 32 vezes maior do que a atividade em aerobiose (figuras 3-C, 4-C e 5-C), confirmando a sensibilidade da proteína NifA N-truncada ao oxigênio. As mesmas estirpes sem o plasmídio transformado (figuras 3-A, 4-A e 5-A) não apresentaram atividade.

Estes resultados confirmam aqueles obtidos por Nishikawa (2010), que realizou experimento semelhante com a proteína NifA N-truncada expressa a partir de vários vetores utilizando o plasmídio pRT22 que possui uma fusão *nifH-lacZ* de *K. pneumoniae* (TULI e MERRICK, 1988). Pode-se observar que a proteína NifA N-truncada é ativa apenas em anaerobiose, revelando uma regulação por oxigênio provavelmente relacionada aos domínios central e C-terminal. Esta atividade é semelhante tanto na presença quanto na ausência de amônio, semelhantes aos resultados encontrados por SOUZA e colaboradores (1999) com a proteína NifA de *H. seropedicae*, mostrando que o domínio N-terminal parece estar envolvido com o controle de NifA por íons amônio e que, quando deletado, a proteína NifA perde esta regulação.

O fato de haver uma atividade residual na condição de presença de oxigênio sugere que a proteína NifA de *A. brasilense* é menos sensível ao oxigênio, se, por exemplo, comparada com a atividade próxima a zero encontrada com a proteína NifA de *H. seropedicae* (MONTEIRO *et al.*, 1999b). Assim, a proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* talvez possa ser mais facilmente purificada e analisada *in vitro*.

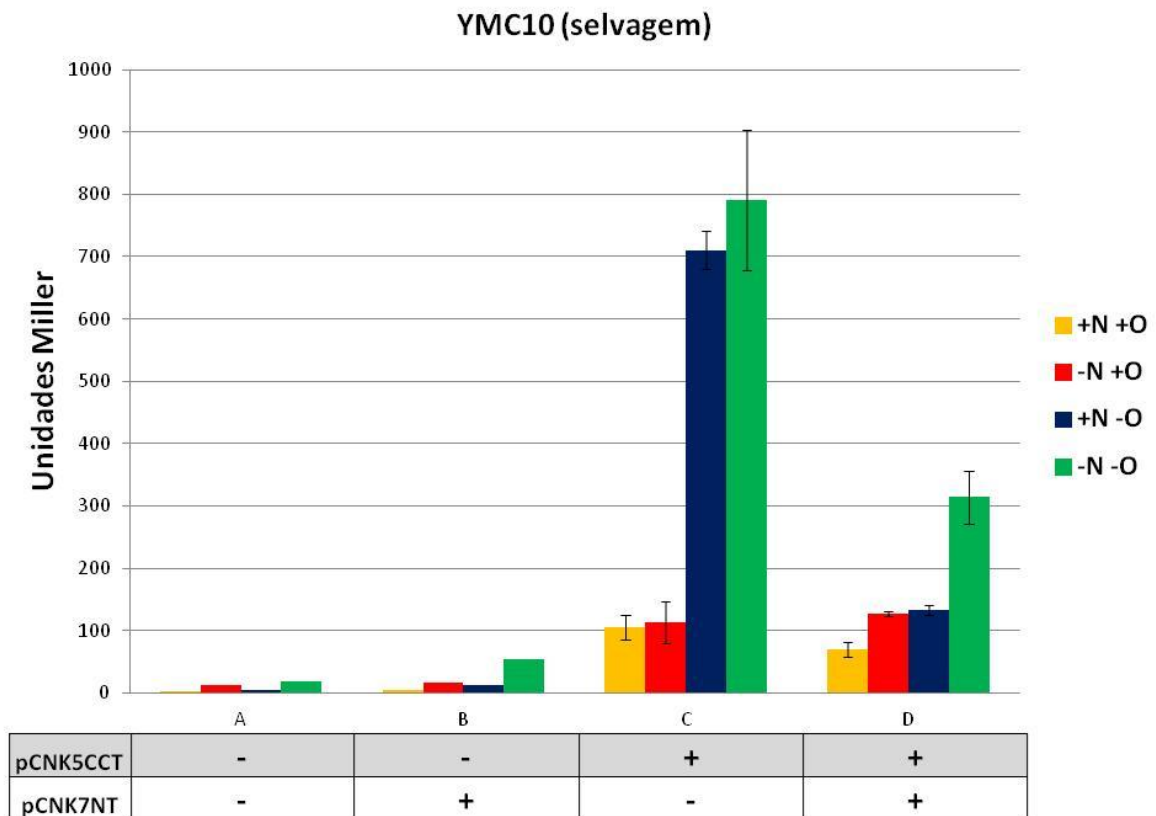


Figura 2 – Ativação transcricional do gene *nifH* *in vivo* pela proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* na estirpe de *E. coli* YMC10 (selvagem). O ensaio foi realizado como descrito em Material e Métodos na presença (+N) ou ausência (-N) de 20 mM de NH_4Cl e na presença (+O) ou ausência (-O) de oxigênio. Os resultados são apresentados em Unidades Miller. (A) Sem plasmídio. (B) Expressando o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* a partir do plasmídio pCNK7NT. (C) Expressando a proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* a partir do plasmídio pCNK5CCT. (D) Co-expressando a proteína NifA N-truncada e seu domínio N-terminal de *A. brasilense* a partir dos plasmídios pCNK5CCT e pCNK7NT, respectivamente.

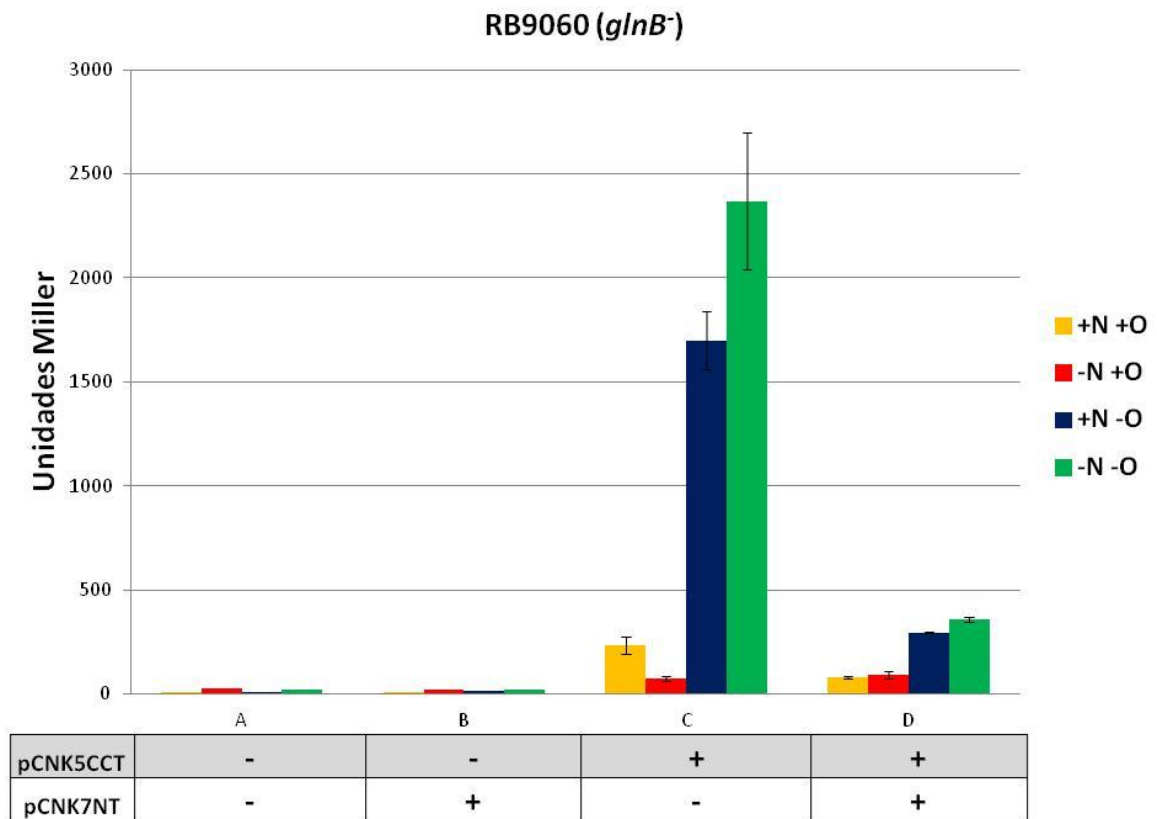


Figura 3 – Ativação transcricional do gene *nifH* *in vivo* pela proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* na estirpe de *E. coli* RB9060 (*glnB*⁻). O ensaio foi realizado como descrito em Material e Métodos na presença (+N) ou ausência (-N) de 20 mM de NH₄Cl e na presença (+O) ou ausência (-O) de oxigênio. Os resultados são apresentados em Unidades Miller. (A) Sem plasmídio. (B) Expressando o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* a partir do plasmídio pCNK7NT. (C) Expressando a proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* a partir do plasmídio pCNK5CCT. (D) Co-expressando a proteína NifA N-truncada e seu domínio N-terminal de *A. brasilense* a partir dos plasmídios pCNK5CCT e pCNK7NT, respectivamente.

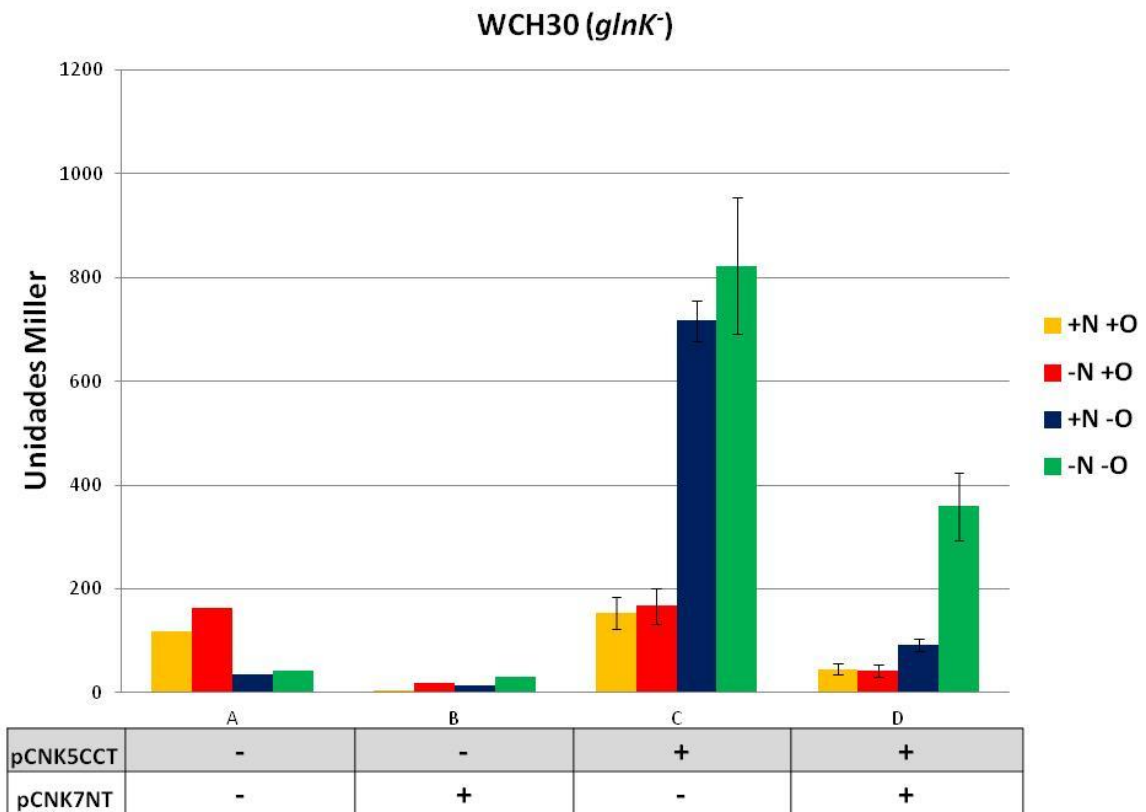


Figura 4 – Ativação transcricional do gene *nifH* *in vivo* pela proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* na estirpe de *E. coli* WCH30 (*glnK*). O ensaio foi realizado como descrito em Material e Métodos na presença (+N) ou ausência (-N) de 20 mM de NH_4Cl e na presença (+O) ou ausência (-O) de oxigênio. Os resultados são apresentados em Unidades Miller. (A) Sem plasmídio. (B) Expressando o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* a partir do plasmídio pCNK7NT. (C) Expressando a proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* a partir do plasmídio pCNK5CCT. (D) Co-expressando a proteína NifA N-truncada e seu domínio N-terminal de *A. brasilense* a partir dos plasmídios pCNK5CCT e pCNK7NT, respectivamente.

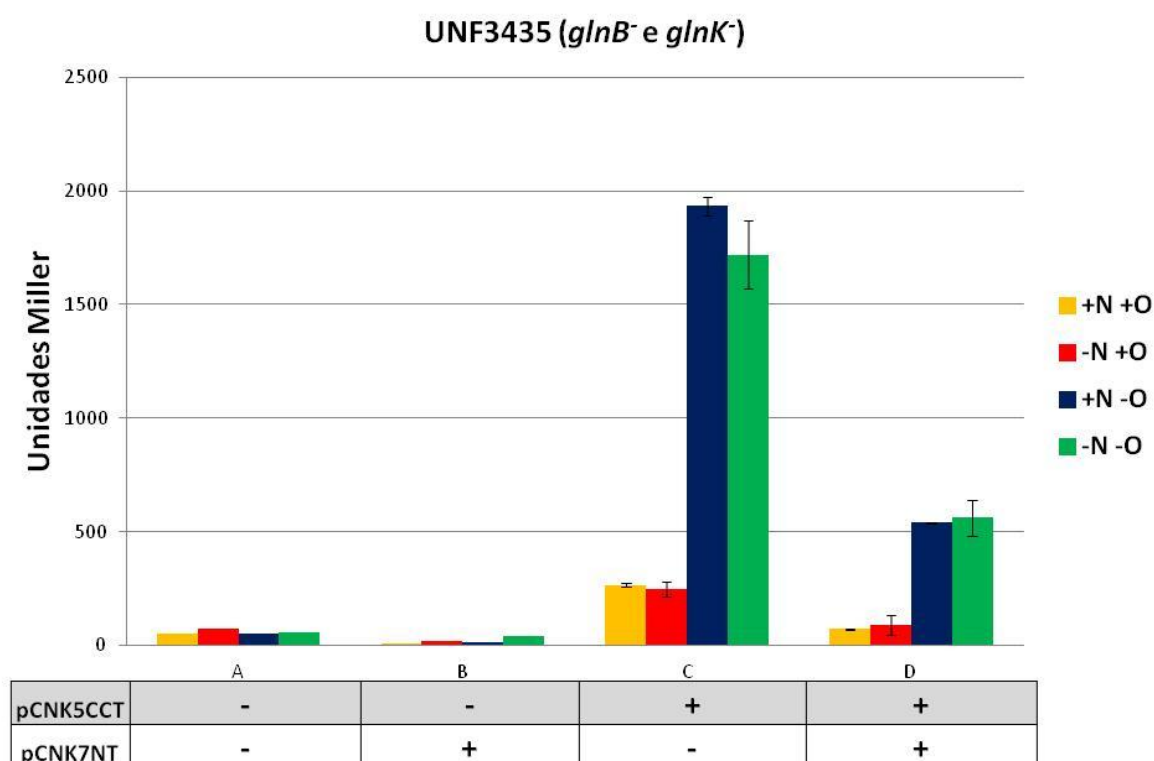


Figura 5 – Ativação transcricional do gene *nifH* *in vivo* pela proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* na estirpe de *E. coli* UNF3435 (*glnB*⁻ e *glnK*⁻). O ensaio foi realizado como descrito em Material e Métodos na presença (+N) ou ausência (-N) de 20 mM de NH₄Cl e na presença (+O) ou ausência (-O) de oxigênio. Os resultados são apresentados em Unidades Miller. (A) Sem plasmídio. (B) Expressando o domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* a partir do plasmídio pCNK7NT. (C) Expressando a proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* a partir do plasmídio pCNK5CCT. (D) Co-expressando a proteína NifA N-truncada e seu domínio N-terminal de *A. brasilense* a partir dos plasmídios pCNK5CCT e pCNK7NT, respectivamente.

6.2 Efeito da co-expressão do domínio GAF N-terminal e da proteína NifA N-truncada em estirpes de *E. coli*

Para determinar o efeito da co-expressão da proteína NifA N-truncada e do domínio N-terminal de NifA, os plasmídios pCNK5CCT e pCNK7NT foram transformados nas estirpes de *E. coli*.

Assim como também observado no ensaio anterior, a proteína NifA N-truncada é ativa apenas na ausência de oxigênio (figuras 2-D, 3-D, 4-D e 5-D). Quando apenas o plasmídio que expressa o domínio N-terminal da proteína NifA está presente (figuras 2-B, 3-B, 4-B e 5-B) não há atividade significativa, mostrando que apenas a porção N-terminal da proteína não é capaz de ativar a fusão *nifH-lacZ*. Mas se compararmos os valores da atividade obtidos quando apenas a proteína NifA N-truncada estava presente, há uma diminuição de 2 a 7 vezes causada pela presença do domínio N-terminal. Esta redução poderia ser devida à presença de um segundo plasmídio, que levaria a uma redução na expressão da proteína NifA N-truncada. Para descartar esta hipótese, foi determinada a atividade de β -galactosidase da *E. coli* expressando a proteína NifA N-truncada e a proteína DraG, que não interfere na atividade da proteína NifA. Neste ensaio, apesar da presença do segundo plasmídio, a atividade da NifA N-truncada foi semelhante a da estirpe contendo apenas o plasmídio pCNK5CCT (dados não mostrados). Assim, a diminuição da atividade de β -galactosidase na presença do plasmídio pCNK7NT ocorre provavelmente porque o domínio N-terminal tem a função de controlar negativamente a atividade da proteína NifA (ARSÈNE, KAMINSKI e ELMERICH, 1996). Como mostrado por Monteiro e colaboradores (1999a), o domínio N-terminal é capaz de inibir a atividade de NifA N-truncada de *H. seropedicae* na presença de amônio também numa estirpe de *E. coli*. No entanto, o mesmo experimento de ativação transcricional *in vivo* foi realizado por Nishikawa (2010) com a proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* e esta regulação *in trans* não foi observada. Os resultados discrepantes podem ser devidos a dois motivos. Primeiro, Nishikawa (2010) utilizou promotores T7 para expressar as proteínas e, nestas condições, pode ter ocorrido uma modificação substancial na expressão da proteína NifA N-truncada, o que não foi determinado. Segundo, Nishikawa (2010) utilizou uma fusão *nifH-lacZ* inserida no plasmídio pRT22, que tem múltiplas cópias por célula, levando a uma

atividade de β -galactosidase muito maior. Além disso, como a estirpe utilizada por Nishikawa (2010) continha três plasmídios, pode ter havido um desbalanço do número de cópias dos plasmídios. Nesta situação, existe a possibilidade de um dos plasmídios serem expulsos após transformados ou a expressão estar comprometida. Neste novo experimento utilizando as estirpes de *E. coli* que possuem a fusão *nifH-lacZ*, a regulação *in trans* do domínio N-terminal pode ser observada. Esta inibição é vista tanto na presença de amônio (+N) como também há uma diminuição da atividade na ausência de amônio (-N). Esta situação provavelmente esteja ocorrendo pela falta da proteína GlnB de *A. brasilense*. Em 1996, Arsène, Kaminski e Elmerich construíram uma proteína NifA N-truncada e observaram que esta estava sempre ativa, independente da presença ou ausência da PII e de amônio, e sugeriram que o domínio N-terminal seria o responsável pela inibição e que a proteína PII seria requerida para ativar NifA, retirando o efeito inibitório do domínio N-terminal. Então, em 2004, Araújo e colaboradores avaliaram o papel das proteínas tipo PII na atividade da proteína NifA de *A. brasilense*, que foi expressa em *E. coli* e cuja atividade foi determinada pela capacidade de ativação do promotor *nifH* de *K. pneumoniae* como uma fusão *nifH-lacZ*. Estes autores demonstraram que a proteína GlnB é essencial para a atividade da NifA na ausência de amônio e de oxigênio em *E. coli*, e que GlnB não pode ser substituída pela sua paróloga GlnZ. Sendo assim, no ensaio realizado, estaria faltando a proteína GlnB de *A. brasilense* para retirar o efeito inibitório do domínio N-terminal sobre a proteína NifA N-truncada na condição de ausência de amônio. Também é possível observar que nas estirpes YMC10 e WCH30, que contêm o gene *glnB* de *E. coli*, existe uma maior diferença entre a condição de presença de amônio para a condição de ausência, sugerindo que GlnB de *E. coli* é provavelmente capaz de prevenir a inibição do domínio N-terminal.

Para confirmar a expressão da proteína NifA N-truncada e do domínio GAF N-terminal de *A. brasilense* foi realizada imunodeteção (como descrito em Material e Métodos 5.8) destas proteínas utilizando anticorpos anti-NifA N-truncada e anti-N-terminal de *H. seropedicae* (figuras 6, 7 e 8). Para realização deste experimento, o extrato celular utilizado durante os ensaios de atividade de β -galactosidase foi submetido a uma eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 10%, que posteriormente foi transferida para uma membrana de PVDF. Como controle positivo, foi utilizado a proteína NifA N-truncada e o domínio GAF N-terminal de *A.*

brasiliense purificados. Como controle negativo foram utilizados os extratos de *E. coli* sem nenhum plasmídio transformado (dados não mostrados).

Como pode ser observado, em todas as situações testadas houve a expressão da proteína de interesse (NifA N-truncada ou domínio N-terminal). Portanto, a regulação da atividade da proteína NifA N-truncada foi devida à presença do domínio regulatório GAF N-terminal.

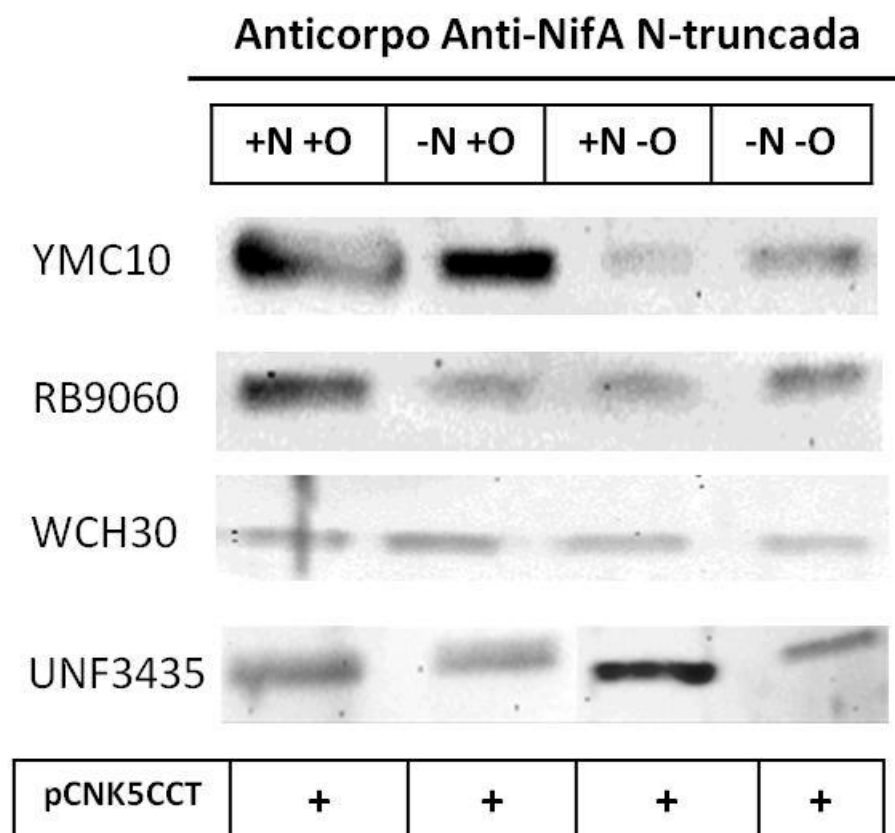


Figura 6 – Imunodeteção da proteína NifA N-truncada de *A. brasiliense* expressa nas estirpes de *E. coli* YMC10, RB9060, WCH30 e UNF3435 transformadas com o plasmídio pCNK5CCT. Foi utilizado anticorpo anti-NifA N-truncada de *H. seropedicae* conforme descrito em Material e Métodos. Os extratos foram obtidos com as células submetidas às condições descritas para o ensaio de ativação transcricional na presença (+N) ou ausência (-N) de 20 mM de NH_4Cl e na presença (+O) ou ausência (-O) de oxigênio. Foram utilizados 0,1 μg de proteína total para o ensaio e a membrana foi revelada por quimioluminescência.

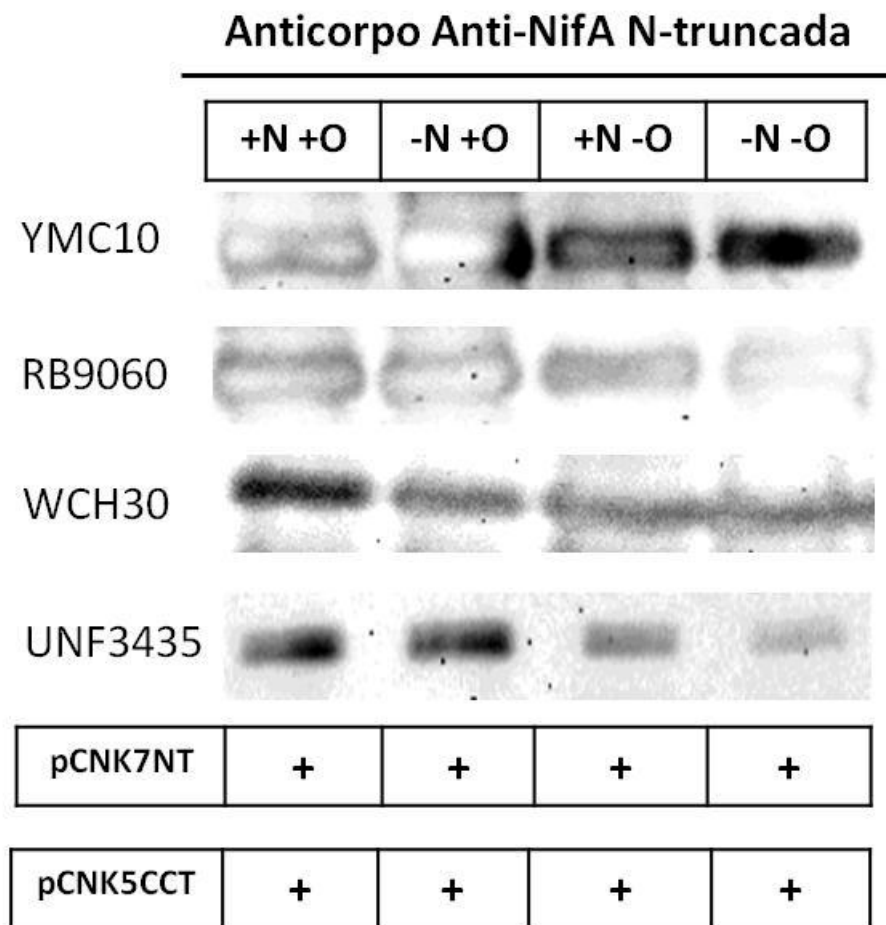


Figura 7 – Imunodeteção da proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* expressa nas estirpes de *E. coli* YMC10, RB9060, WCH30 e UNF3435 transformadas com os plasmídios pCNK5CCT e pCNK7NT. Foi utilizado anticorpo anti-NifA N-truncada de *H. seropecicae* conforme descrito em Material e Métodos. Os extratos foram obtidos com as células submetidas às condições descritas para o ensaio de ativação transcricional na presença (+N) ou ausência (-N) de 20 mM de NH₄Cl e na presença (+O) ou ausência (-O) de oxigênio. Foram utilizados 0,1 µg de proteína total para o ensaio e a membrana foi revelada por quimioluminescência.

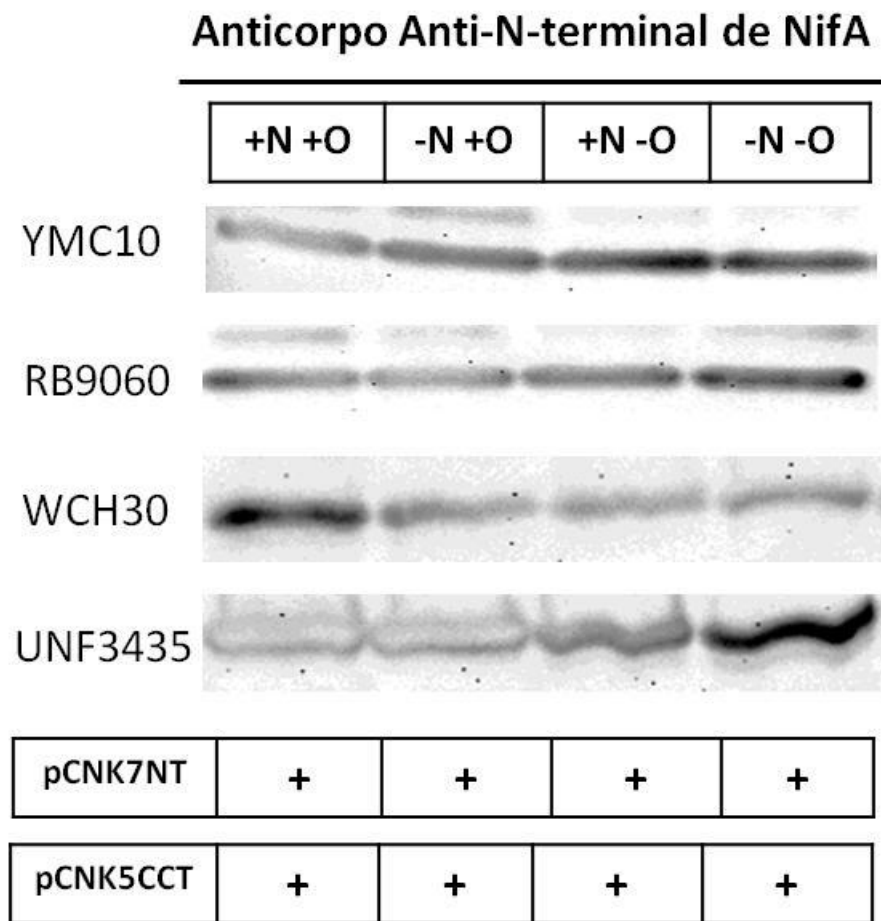


Figura 8 – Imunodeteção do domínio N-terminal da proteína NifA de *A. brasilense* expresso nas estirpes de *E. coli* YMC10, RB9060, WCH30 e UNF3435 transformadas com os plasmídios pCNK5CCT e pCNK7NT. Foi utilizado anticorpo anti-NifA N-terminal de *H. seropecicae* conforme descrito em Material e Métodos. Os extratos foram obtidos com as células submetidas às condições descritas para o ensaio de ativação transcricional na presença (+N) ou ausência (-N) de 20 mM de NH₄Cl e na presença (+O) ou ausência (-O) de oxigênio. Foram utilizados 0,1 µg de proteína total para o ensaio e a membrana foi revelada por quimioluminescência.

6.2 Expressão e Purificação da proteína His-NifA N-truncada de *A. brasilense* em *E. coli* em ambiente livre de oxigênio

O plasmídio pCNpETCCT (NISHIKAWA, 2010), que expressa a proteína His-NifA N-truncada de *A. brasilense* a partir do promotor T7 (vetor pET28a), foi transformado por choque térmico na estirpe de *E. coli* BL21 (DE3), capaz de expressar genes a partir do promotor T7, como descrito em Material e Métodos. Para tanto, a expressão foi induzida com IPTG.

O vetor pET28a expressa a proteína NifA N-truncada fusionada a uma cauda com seis resíduos de histidinas (cauda His) na porção N-terminal. Por isso, a proteína expressa foi denominada His-NifA N-truncada. A presença da cauda de histidina é usada para purificação da proteína por cromatografia de afinidade em coluna contendo íons de um metal de transição. Neste trabalho foi utilizado uma coluna pré-empacotada contendo íons Ni^{2+} (HiTrap Chelating Ni^{2+} 1 mL - GE Healthcare). Estas colunas possuem matriz de agarose acoplada a ácido iminodiacético. Quando carregada com íons metálicos, a proteína fica retida na coluna devido à propriedade de alguns aminoácidos, como a histidina, de se complexarem com íons metálicos.

A expressão da proteína His-NifA N-truncada foi realizada conforme descrito em Material e Métodos item 5.9.1. A temperatura de 16°C para a indução foi utilizada porque em temperaturas baixas, a expressão ocorre mais lentamente, facilitando o correto enovelamento das proteínas e melhorando sua solubilidade. Cerca de 50% da proteína His-NifA N-truncada permaneceu na fração insolúvel. A fração solúvel foi utilizada para a purificação na coluna HiTrap Chelating Ni^{2+} (Material e Métodos item 5.9.2). O protocolo de purificação em aerobiose para a proteína His-NifA N-truncada foi estabelecido por Nishikawa (2010). Em aerobiose, as proteínas retidas na coluna foram eluídas com um gradiente crescente de imidazol (50 mmol/L a 1 mol/L), sendo que a proteína de interesse foi eluída com 300 mmol/L de imidazol e a pureza ficou em torno de 50%. Para melhorar a purificação, as frações foram cromatografadas em uma segunda coluna, contendo heparina. Neste trabalho, a purificação em ambiente livre de oxigênio, o mesmo gradiente de imidazol foi utilizado para a cromatografia de afinidade usando a coluna HiTrap Chelating Ni^{2+} . Em anaerobiose, a proteína NifA N-truncada foi eluída com 200 mmol/L de imidazol (painel A da figura 9). Apesar de a proteína purificada também apresentar contaminantes como na

purificação em aerobiose, as frações não foram submetidas a uma segunda coluna de heparina pelo fato do rendimento da purificação em anaerobiose ter sido baixo e insuficiente para uma segunda etapa cromatográfica.

A proteína His-NifA N-truncada apresentou baixa afinidade pela coluna contendo Ni^{+2} em ambiente livre de oxigênio. Este fato pode ser devido possivelmente a dois fatores: o estado de oxidação do Ni^{+2} pode estar interferindo na afinidade com a cauda de histidinas da proteína ou a conformação da proteína NifA N-truncada em anaerobiose se apresenta de uma forma em que a cauda de histidinas não consiga interagir com a coluna contendo Ni^{+2} . Parte da amostra não se ligou à coluna, como observado na linha 4 do painel A da figura 9 e outra parte foi eluída juntamente com as demais proteínas, de forma inespecífica, no gradiente de 50 e 100 mmol/L de imidazol (linhas 5 a 9 do painel A da figura 9). A proteína His-NifA N-truncada é eluída até a concentração de 400 mmol/L de imidazol (linhas 4 a 6 do painel B da figura 9), apesar de sua concentração ser visivelmente menor do que a encontrada na eluição com 200 mmol/L de imidazol. Como o estado de oxidação do metal de transição utilizado poderia estar interferindo com a afinidade da His-NifA N-truncada pela matriz, a utilização de uma coluna contendo outro íon poderia ser testada como alternativa futura.

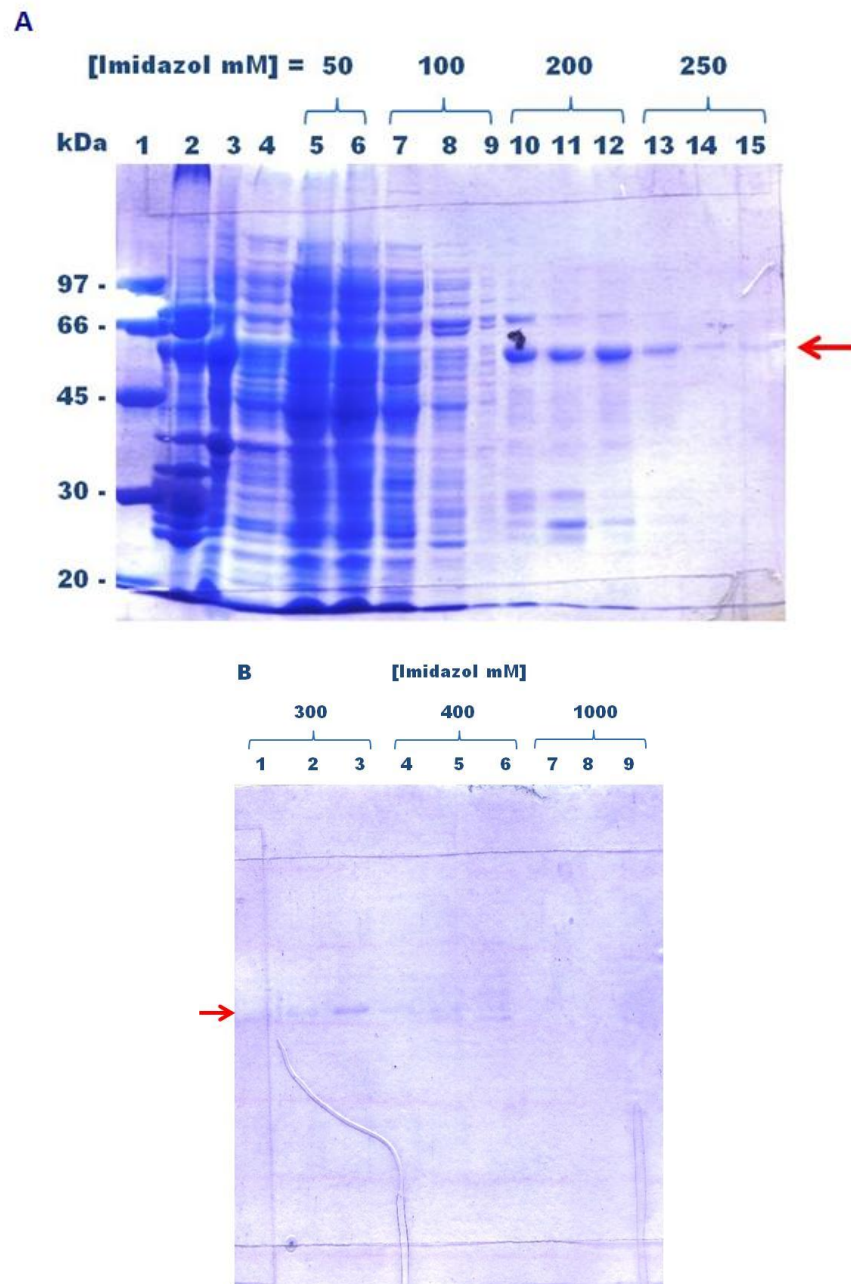


Figura 9 – Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) 10% das frações protéicas obtidas durante a cromatografia de afinidade em coluna HiTrap Chelating ligada a Ni^{+2} (GE Healthcare) em ambiente anaeróbico. A proteína His-NifA N-truncada foi expressa e purificada como descrito em Material e Métodos. As proteínas foram coradas com Coomassie Blue R-250. **Painel A: Linha 1: Marcador de massa molecular de proteína (Fermentas) em kDa. Linhas 2-3: Fração insolúvel. Linha 4: Fração que não se ligou à coluna. Linhas 5-6: Eluição com 50 mmol/L de imidazol. Linhas 7-9: Eluição com 100 mmol/L de imidazol. Linhas 10-12: Eluição com 200 mmol/L de imidazol. Linhas 13-15: Eluição com 250 mmol/L de imidazol. **Painel B:** Linhas 1-3: Eluição 300 mmol/L de imidazol. Linhas 4-6: Eluição com 400 mmol/L de imidazol. Linhas 7-9: Eluição com 1 mol/L de imidazol. A seta indica a proteína His-NifA N-truncada de, aproximadamente, 61 kDa.**

6.3 Ensaio *in vitro* de atividade de ligação da proteína His-NifA N-truncada de *A. brasilense* à região promotora do gene *nifH* de *A. brasilense*

A região interdomínio localizada entre os domínios central e C-terminal possui duas cisteínas que, juntamente com mais duas cisteínas do domínio central, constituem um sítio de ligação de metais em potencial. Foi proposto que um grupo Fe-S possa se ligar a este sítio. Este grupo seria sensível a variações no potencial redox intracelular e responsável pela sensibilidade da proteína NifA à inativação por oxigênio (FISCHER, BRUDERER e HENNECKE, 1988; SOUZA *et al.*, 1999). Nishikawa (2010) demonstrou que uma proteína NifA N-truncada, mesmo purificada em atmosfera com oxigênio, retém a capacidade de se ligar ao promotor *nifB* de *H. seropedicae*.

O domínio C-terminal da proteína NifA apresenta um motivo hélice-volta-hélice conservado responsável pela ligação da proteína ao sítio UAS presente na região promotora dos genes *nif* (MORETT, CANNON e BUCK, 1988). Com o objetivo de determinar a atividade da proteína purificada em ambiente livre de oxigênio, a proteína His-NifA N-truncada foi testada quanto à sua capacidade de ligação à região promotora do gene *nifH* de *A. brasilense*.

Para realização do ensaio, a região promotora do gene *nifH* foi amplificada utilizando oligonucleotídeos como descrito em Material e Métodos (item 5.12). Como pode-se observar na figura 10, o DNA amplificado, correspondente à região de interesse e com 283 pares de bases foi obtido em todas as temperaturas de anelamento testadas, mas nas temperaturas mais baixas (45°C-50°C) é evidente a presença de um produto inespecífico com aproximadamente 500 pares de bases.

Para a clonagem do DNA amplificado no vetor pTZ57R/T (Fermentas) foi utilizado o produto obtido na temperatura de anelamento de 55°C (figura 10 – Linha 10), que possuía uma quantidade suficiente de DNA, sem apresentar grande quantidade de produto inespecífico. A clonagem no vetor pTZ57R/T foi feita utilizando um sistema TA para clonagem direta de produtos de PCR que apresentam extremidade 3' com nucleotídeos adenina despareados, gerados pela Taq DNA Polimerase. A estrutura destes produtos de PCR favorece a clonagem direta a vetores linearizados que contém extremidade T protuberante na ponta 3', complementar ao produto de PCR.

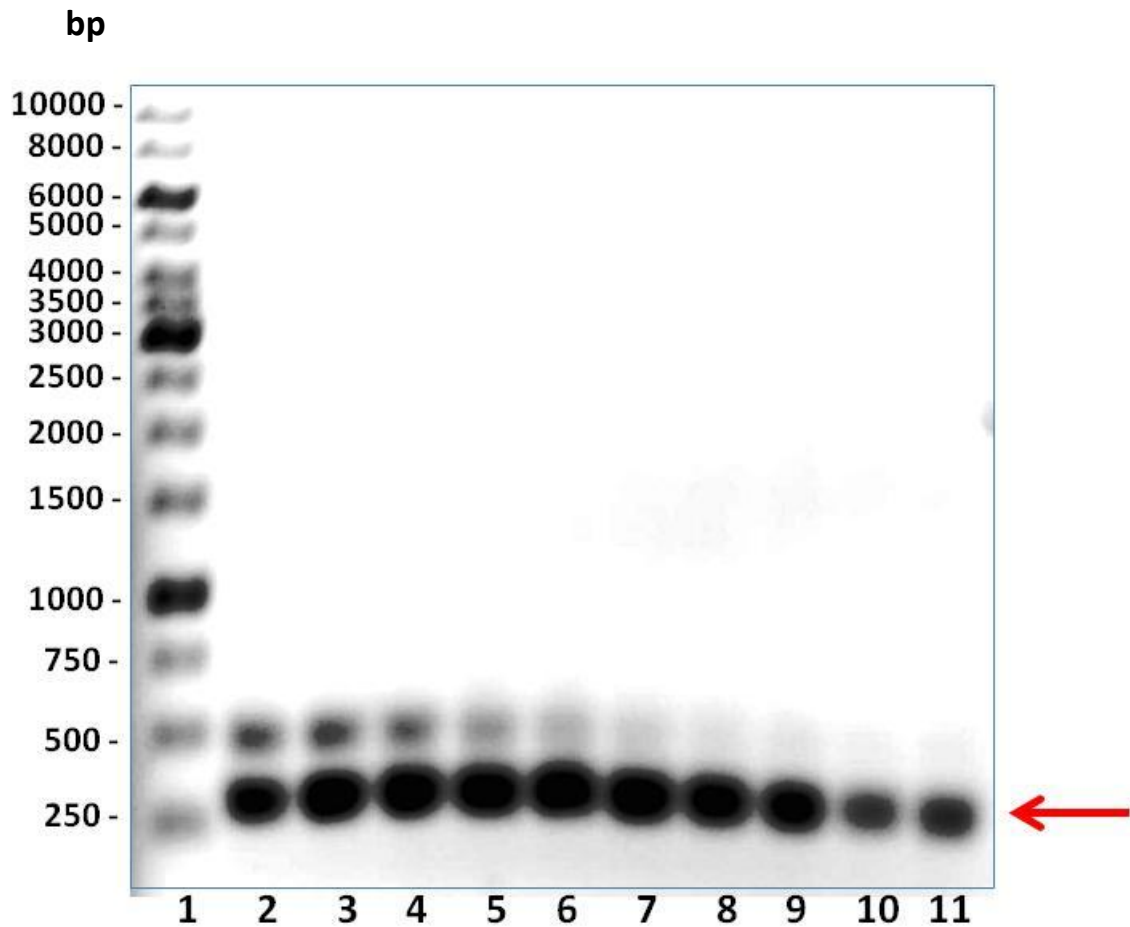


Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X dos produtos de amplificação da região promotora do gene *nifH* de *A. brasilense* obtidos com diferentes temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos. A reação de amplificação do DNA foi realizada como descrito em Material e Métodos. O DNA foi corado com brometo de etídio. O produto de amplificação está indicado com a seta (283 pares de bases). Linha 1: Marcador de DNA 1 Kb Ladder (Fermentas). Linhas 2 – 11: Produtos de PCR obtidos com as diferentes temperaturas de anelamento testadas: 45°C; 46,6°C; 47,7°C; 49°C; 50,4°C; 51,8°C; 53°C; 54,1°C; 55°C e 55,4°C, respectivamente.

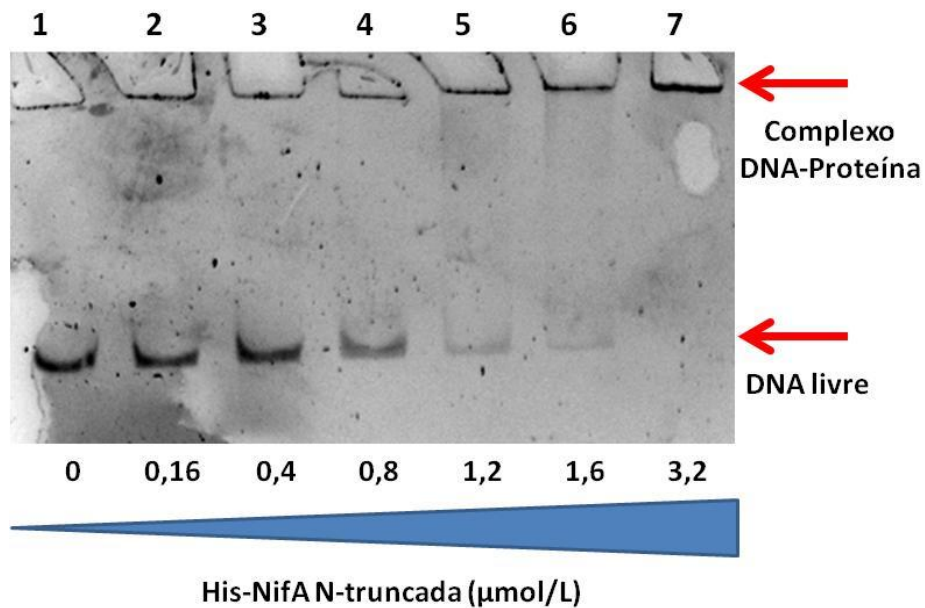
Após a ligação, os clones obtidos foram analisados e submetidos a uma nova reação de PCR, agora utilizando-se oligonucleotídeos Universal e Reverso marcados com fluoróforos VIC e FAM (Applied Biosystems), como descrito em Material e Métodos item 5.12.

O DNA marcado correspondente à região promotora do gene *nifH* de *A. brasilense* foi incubado com concentrações crescentes da proteína His-NifA N-truncada purificada em ambiente livre de oxigênio (fração 12 do painel A da figura 9), que variam de 0,16 a 3,2 $\mu\text{mol/L}$ (concentração calculada considerando a proteína NifA como um monômero). Toda esta etapa foi realizada em anaerobiose (*Glove Box*).

No painel A da figura 11 é possível observar uma banda referente ao DNA livre marcado e à medida que a concentração da proteína aumenta, a banda referente ao DNA marcado começa a diminuir de intensidade e uma banda que não conseguiu migrar no gel e ficou retida nos poços é observada a partir da presença de 0,16 $\mu\text{mol/L}$ da proteína His-NifA N-truncada. O aparecimento desta banda retida no poço do gel é devida a formação do complexo DNA-proteína, com maior massa molecular, que não é capaz de migrar para dentro do gel pelo seu tamanho. À medida que esta banda correspondente ao complexo DNA-proteína se torna mais intensa na altura do poço do gel, a banda correspondente ao DNA marcado desaparece, revelando assim, que o DNA está preso e complexado à proteína His-NifA N-truncada.

Com este resultado, pode-se observar que a proteína His-NifA N-truncada purificada em anaerobiose está ativa por reter sua capacidade de ligação ao DNA, apresentando uma constante de dissociação aparente (K_d aparente) de, aproximadamente, 1 $\mu\text{mol/L}$ (painel B da figura 11), semelhante aos resultados encontrados por Monteiro e colaboradores (2001), mostrando que a proteína NifA N-truncada de *H. seropedicae* é capaz de se ligar ao promotor do gene *nifB* em condições aeróbias com um K_d aparente de 2 $\mu\text{mol/L}$.

A



B

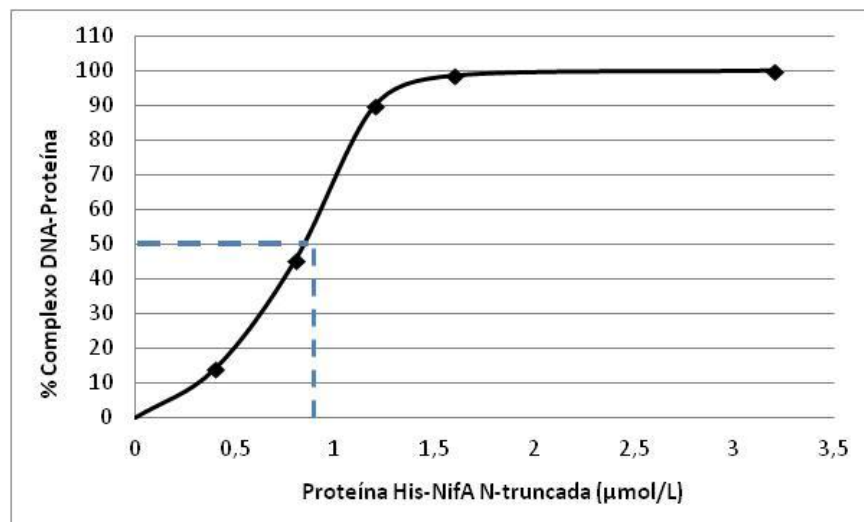


Figura 11 – Ensaio de ligação da proteína His-NifA N-truncada à região promotora do gene *nifH* de *A. brasilense*. Painel A: Gel de poliacrilamida não desnaturante 4% em tampão Tris-Glicina com 8 mM MgCl_2 . Concentrações crescentes de proteína His-NifA N-truncada purificada em anaerobiose foram incubadas com a região promotora do gene *nifH* de *A. brasilense* como descrito em Material e Métodos. Linha 1: DNA correspondente à região promotora do gene *nifH* de *A. brasilense* marcado com fluoróforo na ausência da proteína. Linhas 2-8: promotor do gene *nifH* incubado com concentrações indicadas de His-NifA N-truncada. O DNA foi visualizado no comprimento de onda de 264 nm utilizando sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP). Painel B: Gráfico mostrando a constante de dissociação aparente (K_d aparente), que corresponde à concentração da proteína His-NifA N-truncada quando há formação de 50% do complexo DNA-proteína.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os ensaios de ativação transcricional *in vivo* utilizando as estirpes de *E. coli* revelaram que a proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* possui maior atividade na ausência de oxigênio, confirmando que esta variante da proteína NifA é ativa e reforçando que a sensibilidade ao oxigênio da proteína NifA não é relacionada com o domínio N-terminal (NISHIKAWA, 2010). As atividades da proteína NifA N-truncada na presença e ausência de amônia são similares. Assim, a retirada do domínio N-terminal leva a perda da regulação por amônia, situação também encontrada em *H. seropedicae* (SOUZA *et al.*, 1999). Foi ainda mostrado que quando a proteína NifA N-truncada é co-expressa com o domínio N-terminal, este é capaz de inibir *in trans* a proteína NifA N-truncada em altas concentrações de amônio, também de forma semelhante a NifA de *H. seropedicae* (MONTEIRO *et al.*, 1999a), sugerindo que os mecanismos de regulação da proteína NifA de *A. brasilense* são comuns ao de *H. seropedicae*. Os resultados também sugerem que a proteína NifA N-truncada não é regulada pela presença dos genes endógenos que codificam para as proteínas PII (*glnK* ou *glnB*) de *E. coli*, mas que na presença do domínio N-terminal, a regulação por amônia requer a proteína GlnB mas não GlnK, recuperando a regulação por NH_4^+ da proteína NifA íntegra (ARAÚJO *et al.*, 2004). Os ensaios *in vivo* também sugerem que a proteína NifA N-truncada é menos sensível ao oxigênio se comparada a proteína NifA N-truncada de *H. seropedicae* (MONTEIRO *et al.*, 1999b). Dessa forma, a proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* poderia ser mais facilmente purificada e analisada *in vitro*. Os resultados obtidos com a purificação em anaerobiose revelaram que a proteína NifA N-truncada tem baixa afinidade pela coluna contendo Ni^{+2} , o que leva a um baixo rendimento da proteína purificada. Esta é uma das maiores dificuldades para as análises *in vitro* da proteína NifA: obter quantidades suficientes de proteína purificada. Apesar desta dificuldade, foi possível realizar um ensaio *in vitro* de atividade de ligação da proteína NifA N-truncada à região promotora de *nifH* de *A. brasilense*. Passaglia e colaboradores (1998) mostraram que a proteína NifA de *A. brasilense* é capaz de ligar a *nifH* *in vitro* sob condições aeróbicas. Ainda, Nishikawa (2010) mostrou que a proteína NifA N-truncada, apesar de ser inativa *in vivo* sob condições aeróbicas, ainda retém a atividade de ligação ao DNA, sugerindo que a forma oxidada de NifA liga DNA, mas

não é competente para ativar a transcrição. Provavelmente, a oxidação do grupo Fe-S desencadeie mudanças conformacionais que afetam a ligação dos nucleotídeos e/ou a hidrólise necessária para a ativação transcricional (OLIVEIRA *et al.*, 2009; KREY, PUHLER e KLIPP, 1992). Esta oxidação tornaria NifA inativa, comprometendo a atividade catalítica do domínio central. O ensaio de ligação ao DNA realizado em anaerobiose com a proteína NifA purificada também na ausência de oxigênio mostrou que a proteína foi capaz de se ligar à *nifH* com um K_d aparente de, aproximadamente, 1 $\mu\text{mol/L}$, semelhante ao K_d aparente encontrado para a proteína NifA de *H. seropedicae* em condições aeróbias (MONTEIRO *et al.*, 2001).

8. CONCLUSÕES

- A proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* é capaz de ativar *in vivo* a transcrição do gene *nifH* de *K. pneumoniae* a partir de uma fusão *nifH-lacZ* cromossomal presente nas estirpes de *E. coli* YMC10 (selvagem), RB9060 (*glnB*⁻), WCH30 (*glnK*) e UNF3435 (*glnB*⁻ e *glnK*⁻) em condição de ausência de oxigênio e presença ou ausência de amônio.
- A proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* é ativa na condição de ausência de oxigênio, revelando regulação por oxigênio relacionada aos domínios central e C-terminal.
- A atividade da proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* é semelhante tanto na presença quanto na ausência de amônio, confirmando que o domínio N-terminal parece estar envolvido com o controle de NifA por íons amônio e que, quando deletado, a proteína NifA perde esta regulação.
- Há uma diminuição da atividade da proteína NifA N-truncada de *A. brasilense* quando co-expressa com seu domínio N-terminal, revelando que esta porção tem a função de controlar negativamente a atividade da proteína NifA na presença de íons amônio.
- O domínio N-terminal da proteína NifA, quando co-expresso com a proteína NifA N-truncada, é capaz de recuperar *in trans* a regulação por íons amônio da proteína NifA N-truncada.
- A purificação da proteína His-NifA N-truncada em anaerobiose mostrou que esta proteína é eluída com 200 mmol/L de imidazol.
- A proteína His-NifA N-truncada de *A. brasilense* purificada em ambiente livre de oxigênio é capaz de se ligar ao promotor do gene *nifH* de *A. brasilense*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, L. M.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 491-495, 2004.

ARAVIND, L.; PONTING, C. P. The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. **Trends Biochemical Science**, v. 12, p. 458-459, 1997.

ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. PII Signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 1, p. 80-105, 2001.

ARCONDÉGUY, T.; van HEESWIJK, W.C.; MERRICK, M. Studies on the roles of GlnK and GlnB in regulating *Klebsiella pneumoniae* NifL-dependent nitrogen control. **FEMS Microbiology Letters**, v. 180, p. 263-270, 1999.

ARSÈNE F.; KAMINSKI, A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by P_{II} in *Azospirillum brasilense*: evidence for a regulatory role of the NifA N-Terminal domain. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 16, p. 4830-4838, 1996.

ARSÈNE F.; KAMINSKI, A.; ELMERICH, C. Control of *Azospirillum brasilense* NifA activity by PII: effect of replacing Tyr residues of the NifA N-terminal domain on NifA activity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, p. 339-343, 1999.

AUSTIN, S.; BUCK, M.; CANNON, W.; EYDMANN, T.; DIXON, R. Purification and *in vitro* activities of the native nitrogen fixation control proteins NifA and NifL. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 3460-3465, 1994.

AUSTIN, S.; HENDERSON, N.; DIXON, R. Characterization of the *Klebsiella pneumoniae* nitrogen-fixation regulatory proteins NifA and NifL *in vitro*. **European Journal of Biochemistry**, v. 187, p. 353-360, 1990.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUCK, M.; WOODCOCK, J.; CANNON, W.; MITCHENALL, L.; DRUMMOND, M. Positional requirements for the function of *nif*-specific upstream activator sequences. **Molecular and General Genetics**, v. 210, p. 140-144, 1987.

BURNETTE, W. N. "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry**, v. 112, p. 195-203, 1981.

CANNON, F. C.; DIXON, R. A.; POSTGATE, J. R. Chromosomal integration of *Klebsiella pneumonia* nitrogen fixation genes in *E. coli*. **Journal of General Microbiology**, v. 80, p. 227-239, 1974.

CHEN, S.; LIU, L.; ZHOU, X.; ELMERICH, C.; LI, J. L. Functional analysis of the GAF domain of NifA in *Azospirillum brasilense*: effects of Tyr-Phe mutations on NifA and its interaction with GlnB. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 273, p. 415-422, 2005.

CHUNG, C. T.; NIEMELA, S. L.; MILLER, R. H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 86, p. 2172-2175, 1989.

CONTRERAS, A.; DRUMMOND, M.; BALI, A.; BLANCO, G.; GARCIA, E.; BUSH, G.; KENNEDY, C.; MERRICK, M. The product of the nitrogen fixation regulatory gene *nfrX* of *Azotobacter vinelandii* is functionally and structurally homologous to the uridylyltransferase encoded by *glnD* in enteric bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 24, p. 7741-9, 1991.

de ZAMAROCZY, M. Structural homologues PII and PZ of *Azospirillum brasilense* provide intracellular signaling for selective regulation of various nitrogen-dependent functions. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 449-463, 1998.

de ZAMAROCZY, M.; DELORME, F.; ELMERICH, C. Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of *glnB* and *glnA* in *Azospirillum*. **Molecular and General Genetics**, v. 224, n. 3, p. 421-430, 1990.

de ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 9, p. 2507-2515, 1993.

de ZAMAROCZY, M.; PAQUELIN, A.; PELTRE, G.; FORCHHAMMER, K.; ELMERICH, C. Coexistence of two structurally similar but functionally different PII protein in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 4143-4149, 1996.

DEAN, D. R.; BOLIN, J. T.; ZHENG, L. Nitrogenase metallocusters: structures, organization and synthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 6737-6744, 1993.

DEAN, D.R.; JACOBSEN, M. R. Biochemical and genetics of nitrogenase. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Eds.). **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, p. 763-834, 1992.

DEKHIL, B. S.; CAHILL, M.; STACKEBRANT, E.; SLY, L. I. Transfer of *Conglomeromonas largomibilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Comglomeromonas largomobilis* subsp. *paroensis* to the new type species of *Comglomeromonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, p. 72-77, 1997.

DIXON, R.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T.; HILL, S. O.; MACHEROUX, P.; POOLE, R.; REYES-RAMIREZ, F.; SOBZCYK, A.; SODERBACK, E. Regulation of *nif* gene expression in free-living diazotrophs: recent advances. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W. (eds.). **Biological nitrogen fixation in the 21st century**. Kluwer Academic, p. 87-92, 1997.

DIXON, R.; KHAN, D. Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. **Nature Reviews**, v. 2, p. 621-631, 2004.

DÖBEREINER, J. The *Genera Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In: BALLOWS, A.; TRUPPER, H. G.; DWORKING, M.; HARDER, W. (eds.). **The Prokaryotes**. Springer-Verlag, ed. 2, v. 3, p. 2236-3353, 1991.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: **Proceedings of the 1st International Symposium on N₂ Fixation** (Newton, W.E. and Nyman, C.J., Eds.), Washington State University Press: Pullman, p. 518-538, 1976.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 17-26, 2001.

FADEL-PICHETH, C. M.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G., PEDROSA, F. O. Regulation of *Azospirillum brasilense nifA* gene expression by ammonium and oxygen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 281-288, 1999.

FISCHER, H. M. Genetic Regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. **Microbiological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 352-386, 1994.

FISCHER, H. M.; BRUDERER, T.; HENNECKE, H. Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/or metal binding. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 2207-2224, 1988.

FISCHER, H.; FRITSCH, S.; HERZOG, B.; HENNECK, H. Critical spacing between two essential cysteine residues in the interdomain linker of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein. **FEBS Letters**, v. 225, p. 167-171, 1989.

GONZÁLEZ, V.; OLVERA, L.; SOBERÓN, X.; MORETT, E. *In vivo* studies on the positive control function of NifA: a conserved hydrophobic amino acid patch at the central domain involved in transcriptional activation. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 55-67, 1998.

HE, L.; SOUPENE, E.; NINFA, A.; KUSTU, S. Physiological Role for the GlnK Protein of Enteric Bacteria: Relief of NifL Inhibition under Nitrogen-Limiting conditions. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 6661-6667, 1998.

HILL, S.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T.; JONES, T.; DIXON, R. *Azotobacter vinelandii* NifL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen-fixation genes via a redox-sensitive switch. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 93, p. 2143-2148, 1996.

HO, Y. S.; BURDEN, L. M.; HURLEY, J. H. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. **EMBO Journal**, v. 19, p. 5288-5299, 2000.

HOTEL, A. H.; MERRICK, M. Identification of the *Klebsiella pneumoniae glnB* gene: nucleotide sequence of the wild-type and mutant alleles. **Molecular and General Genetics**, v. 215, p. 134-138, 1988.

HOWARD, J. B.; REES, D. C. Structural basis of biological nitrogen fixation. **Chemical Review**, v. 96, p. 2965-2982, 1996.

HUERGO, L. F.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Regulation of *glnB* gene promoter expression in *Azospirillum brasilense* by the NtrC protein. **FEMS Microbiology Letters**, v. 223, p. 33-40, 2003.

JACK, R.; de ZAMAROCZY, M.; MERRICK, M. The signal transduction protein GlnK is required for NifL-dependent nitrogen control of *nif* expression in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 1156-1162, 1999.

KHAMAS, K. M.; AGERON, E.; GRIMONT, P. A. D.; KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in Microbiology**, v. 140, p. 45-55, 1989.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, v. 33, p. 389-397, 1994.

KOCHER, T.D.; WILSON, A. C. DNA amplification by the polymerase chain reaction. In: BROWN, T. A., **Essential Molecular Biology: A Practical Approach**, IRL Press, Oxford University Press, Oxford, p. 185-208, 1991.

KREY R., PUHLER A., KLIPP W. A defined amino acid exchange close to the putative nucleotide binding site is responsible for an oxygen-tolerant variant of the *Rhizobium meliloti* NifA protein. **Molecular and General Genetics**, v. 234, p. 433-441, 1992.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembling of the head of the bacteriophage T7. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEE, H. S.; BERGER, D. K.; KUSTU, S. Activity of purified NifA, a transcriptional activator of nitrogen fixation genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 90, p. 2266-2270, 1993.

LIANG, Y. Y.; ARSENE, F.; ELMERICH, C. Characterization of the *ntrBC* genes of *Azospirillum brasilense*. Their involvement in the regulation of nitrogenase synthesis and activity. **Molecular and General Genetics**, v. 240, p. 188-196, 1993.

LIANG, Y. Y.; de ZAMAROCZY, M.; ARSÈNE, F.; PAQUELIN, A.; ELMERICH, C. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of *nifA*, *glnA* and *glnB* gene products. **FEMS Microbiology Letters**, v. 100, p. 113-120, 1992.

LIANG, Y. Y.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Identification of a *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 2735-2744, 1991.

LITTLE, R.; DIXON, R. The amino-terminal GAF domain of *Azotobacter vinelandii* NifA binds 2-oxoglutarate to resist inhibition by NifL under nitrogen-limiting conditions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 2871-2878, 2003.

MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 549-553, 1991.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 55, p. 417-430, 1983.

MARTINEZ-ARGUDO, I.; LITTLE, R.; SHEARER, N.; JOHNSON, P.; DIXON, R. The NifL-NifA system: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 3, p. 601-610, 2004.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2805-2809, 2007a.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 620-624, 2007b.

MERRICK, M. J. Nitrogen control of the *nif* regulon in *Klebsiella pneumoniae*: involvement of the *ntrA* gene and analogies between *ntrC* and *nifA*. **EMBO Journal**, v. 2, p. 39-44, 1983.

MERRICK, M. J. In a class of its own — the RNA polymerase sigma factor σ^{54} (σ^N). **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 903-909, 1993.

MERRICK, M. J. Nitrogen control of nitrogen fixation in free-living diazotrophs. In: KLIPP, W.; MASEPOHL, B.; GALLON, J. R.; NEWTON, W. E. **Genetics and regulation of nitrogen fixation in free-living bacteria**. Amsterdam, p. 97-233, 2004.

MERRICK, M.; CHAMBERS, S. The Helix-Turn-Helix Motif of σ^{54} Is Involved In Recognition of the -13 promoter region. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 7221-7226, 1992.

MERRICK, M. J.; HILL, S.; HENNECKE, M.; HAHN, M.; DIXON, R.; KENNEDY, C. Repressor properties of the *nifL* gene product in *Klebsiella pneumoniae*. **Molecular and General Genetics**, v. 185, p. 75-81, 1982.

MILLER, J. H. **A Short Course in Bacterial Genetics: a Laboratory Manual and Handbook for *E. coli* and Related Bacteria**. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1992.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. *In-trans* regulation of the N-truncated-NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae* by the N-terminal domain. **FEBS Letters**, v. 180, p. 157-161, 1999a.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Expression and functional analysis of a N-truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Letters**, v. 447, p. 283-286, 1999b.

MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; WASSEM, R.; YATES, G. M.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S. Inter-domain cross-talk controls the NifA protein activity of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Letters**, v. 508, p. 1-4, 2001.

MORETT, E. BUCK, M. NifA dependent *in vivo* protection demonstrates that the upstream activator sequence of *nif* promoters is a protein binding site. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 85, p. 9401-9405, 1988.

MORETT, E.; CANNON, W.; BUCK, M. The DNA-binding domain of the transcriptional activator protein NifA resides in its carboxy terminus, recognises the upstream activator sequences of *nif* promoters and can be separated from the positive control function of NifA. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 24, p. 11469-11488, 1988.

MORETT, E.; SEGOVIA, L. The σ^{54} bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 19, p. 6067-6074, 1993.

NISHIKAWA, C. Y. Expressão e caracterização de uma forma N-truncada da proteína NifA de *Azospirillum brasilense*. 2010. 98f. Tese (Mestrado em Ciências-Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

OLIVEIRA, M. A. S.; BAURA, V. A.; AQUINO, B.; HUERGO, L. F.; KADOWAKI, M. A. S.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; DIXON, R.; PEDROSA, F. O.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R. A. Role of conserved cysteine residues in *Hesbaspirillum seropedicae* NifA activity. **Research in Microbiology**, v. 160, p. 389-395, 2009.

PATRIQUIN, D.G.; DÖBEREINER, J.; JAIN, D.K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 900-915, 1983.

PEDROSA, F. O. Fixação Biológica de Nitrogênio: Fértil Idéia. **Ciência Hoje**, v. 6, p. 12-13, 1987.

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntrC* (*glnG*) type genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 55, p. 95-101, 1984.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; HOU, W.; LIU, Y.; WANG, E. T.; TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1263-1271, 2006.

POSTGATE, J. R. **The Fundamentals of Nitrogen Fixation**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 375-385, 1982.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; de LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, p. 43-51, 1987.

REYES-RAMIREZ, F.; LITTLE, R.; DIXON, R. Role of *Escherichia coli* nitrogen regulatory genes in the nitrogen response of the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA complex. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 3076-3082, 2001.

RICKWOOD, D.; HAMES, B. D. **Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach**. 2 ed. New York: Oxford University Press, 1990.

ROBERTS, G. P.; MACNEIL, T.; MACNEIL, D.; BRILL, W. J. Regulation and characterization of protein products coded by the *nif* (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 136, p. 267-279, 1978.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHINDELIN, H.; KISKER, C.; SCHELESSMAN, J.; HOWARS, J. B.; REES, D. C. Structure of ADP-AlF₄⁻-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. **Nature**, v. 387, p. 370-376, 1997.

SHAPIRO, B. M. The glutamine synthetase deadenylylating enzyme system from *Escherichia coli*: resolution into two components, specific nucleotide stimulation, and cofactor requirements. **Biochemistry**, v. 8, p. 659-670, 1969.

SINGH, M.; TRIPATHI, A. K.; ROBERTS, G. P. Identification of a regulatory *nifA* type gene and physical mapping cloned new *nif* regions of *A. brasilense*. **Molecular and General Genetics**, v. 219, p. 235-240, 1989.

SON, R. S.; RHEE, S. G. Cascade control of *Escherichia coli* glutamine synthetase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 18, p. 8690-8695, 1987.

SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; DRUMMOND, M.; RIGO, L.U.; YATES, M.G. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA Activity by Ammonium Ions and Oxygen. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 681-684, 1999.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 487-506, 2000.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, n. 8, p. 967-980, 1978.

TULI, R.; MERRICK, M. Over-production and characterization of the *nifA* gene product of *Klebsiella pneumonia* – the transcriptional activator of *nif* gene expression. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 425-432, 1988.

van HEESWIJK, W. C.; HOVING, S.; MOLENAAR, D.; STEGEMAN, B.; KHAN, D.; WESTERHOFF, H. V. An alternative PII protein in the regulation of glutamine synthetase in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 133-146, 1996.

XIE, C. H.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1435-1438, 2005.

WHITEHALL, S.; AUSTIN, S.; DIXON, R. DNA supercoiling response of the σ^{54} – dependent *Klebsiella pneumoniae nifL* promoter *in vitro*. **Journal of Molecular Biology**, 1992.

WOOTTON, J. C.; DRUMMOND, M. The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory protein. **Protein Engineering**, v. 2, p. 535-543, 1989.

YATES, M. G. Biochemistry of nitrogen fixation. In: MIFTIN, B. (ed.) **The biochemistry of plants**. New York: Academic Press, v. 5, p. 1-64, 1980.

YATES, M. G. The enzymology of molybdenum-dependent nitrogen fixation. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Eds.). **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman & Hall, p. 685-735, 1992.

YOUNG, C. C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; HO, M. J.; ARUN, A. B.; LAI, W.A.; REKHA, P. D.; SHEN, F. T.; HUNG, M. H.; CHEN, W. M.; YASSIN, A. F. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58 (Pt 4), p. 959-963, 2008.

ZHOU, X. Y.; ZOU, X. X.; LI, J. L. Interaction between GlnB and the N-terminal domain of NifA in *Azospirillum brasilense*. **Chinese Science Bulletin**, v. 53, n. 22, p. 3546-3552, 2008.